GENETISCHE ANALYSE DES ColM-LOKUS UND NUKLEOTIDSEQUENZ DES COLICIN M-IMMUNITÄTSPROTEINS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Tobias Ölschläger
aus Langenau

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0074

GENETISCHE ANALYSE DES ColM-LOKUS UND NUKLEOTIDSEQUENZ DES COLICIN M-IMMUNITÄTSPROTEINS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Tobias Ölschläger
aus Langenau

1986

Tag der mündlichen Prüfung:	30.01.1986
Dekan:	Professor Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Hantke

Für Ulla und Nadja

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Braun danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Krauel, Herrn Köster und Herrn Schramm für die vielen Anregungen und Diskussionen, wie auch für die freundschaftliche Atmosphäre in den Jahren gemeinsamer Labortätigkeit.

Für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung durch Herrn Dr. Fischer und Herrn Dr. Heller möchte ich mich hier ebenfalls bedanken.

Dieser Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Lehrstühle I und II, die mir bei der Lösung vieler technischer und organisatorischer Probleme geholfen haben.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
	Verzeichnis der Abkürzungen	
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Material	7
2.1.1.	Chemicalien	7
2.1.2.	Nährmedien und Puffer	8
2.1.3.	Bakterienstämme	10
2.1.4.	Restriktionskarten der benutzten Plasmidvektoren und Transposonen	12
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Kultivierungsbedingungen	16
2.2.2.	Plasmidisolierung	16
2.2.2.1.	Schnelle Isolierungsmethode für kleine Plasmidmengen aus vielen Stämmen	16
2.2.2.2.	Schnelle präparative Methode	17
2.2.2.3.	Präparative Methode mit Reinigung der DNS mittels CsCl-Gradientenzentrifugation	
2.2.3.	Bestimmung der DNS Konzentration	21
2.2.4.	Schneiden von Plasmid-DNS mit Restriktionsenzymen	21
2.2.5.	Agarosegelelektrophorese	23
2.2.6.	Größenbestimmung von Restriktionsfragmenten	24
2.2.7.	Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarose	25
2.2.8.	Bedingungen für die Ligation	26
2.2.9.	Transformation	27
2.2.10.	Methoden zur Selektion auf oder "Screening" nach Transformanten mit einem rekombinanten Plasmid	28
2.2.11.	Test auf Colicin M-Produktion	29

2.2.12.	Test auf Colicin-Immunität	29
2.2.13.	Konjugation	30
2.2.14.	Tn1000-Mutagenese	31
2.2.15.	Polyacrylamidgelelektrophorese	31
2.2.15.1.	Acrylamidgelelektrophorese nach Lugtenberg	32
2.2.15.2.	Gradienten-Acrylamidgele	33
2.2.15.3.	Harnstoffgele	34
2.2.16.	Fluorographie	34
2.2.17.	Expression plasmidcodierter Proteine im Minizellsystem	35
2.2.18.	Anreicherung von Proformen	36
2.2.19.	Protein A-Sepharose-unterstützte Immunfällung	37
2.2.20.	Nachweis plasmidcodierter Proteine im Maxizellsystem	38
2.2.21.	Expression klonierter Gene im DNS-gesteuerten *in vitro* Translationssystem	39
2.2.22.	DNS-Sequenzierung mit der Didesoxy-methode	39
2.2.22.1.	Klonierung in M13 Phagen	40
2.2.22.2.	Isolierung einsträngiger M13-DNS	41
2.2.22.3.	Schema für die Herstellung der Nukleo-tidlösungen	42
2.2.22.4.	Verbinden von Primer und Template	43
2.2.22.5.	Die Sequenzierungsreaktion	44
2.2.22.6.	Gießen der Acrylamidgele	45
2.2.22.7.	Elektrophorese	46
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Klonierung von *cmi*, *cma* und *cbi*	48
3.2.1.	Tn5-Insertionsmutanten von pTO163	52
3.2.2.	Tn5-Mutanten von pES2	52
3.3.	Nachweis der Produkte und der Trans-criptionsrichtung von *cma* und *cba*	53

3.4.	Versuche zum Nachweis einer Proform von Colicin M	58
3.5.	"French-Press"-Aufschluß von Colicin M-Produzenten und Test der erhaltenen Fraktionen auf Colicin M-Aktivität	58
3.6.	Subklonierung von *cmi*	59
3.7.	Tn1000-Mutagenese von pTO195	60
3.8.	Versuche zur Subklonierung von *cma*	61
3.9.	Untersuchung der Fraktionen von *cmi*$^+$-Kulturen auf ihre Schutzwirkung gegen Colicin M	62
3.10.	Versuche zur Identifizierung des *cmi*-Genprodukts	63
3.11.	Sequenzierung von *cmi*	68
3.12.	Analyse der Nukleotidsequenz	70
3.13.	Untersuchungen zum Codongebrauch und GC-Gehalt	76
3.14.	Die Aminosäuresequenz	77
3.15.	Klonierung von Teilbereichen des Immunitätsgens	79
3.16.	Versuche zum Nachweis der Proteine determiniert von Teilen des *cmi*-Bereichs	83
4.	Diskussion	89
4.1.	Klonierung von *cmi*, *cma* und *cbi*	89
4.2.	Tn5-Insertionsmutanten von pTO163 und pES2	90
4.3.	Versuche zur Subklonierung von *cma* und *cmi*	90
4.4.	Nachweis des Immunitätsproteins	91
4.5.	Sequenzierung des *cmi*-Bereichs	92
4.6.	Subklonierung von Teilen des *cmi*-Bereichs	93
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literatur	98

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CDTA	Cyclohexan-Diamin-Tetraessigsäure
d	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis(ß-Aminoäthyläther)N,N,N',N', Tetraessigsäure
G	Guanin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
k	Kilodalton
kB	Kilobasen
MOPS	Morpholino-Propan-Sulfonsäure
OD_x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von xnm
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Trypton-Yeast
UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-ß-D-Galaktosid

1. EINLEITUNG

Von Bakterien werden verschiedene toxische Stoffe synthetisiert. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Klasse umfasst die auf Eukaryonten wirkenden Toxine. Die Zweite beinhaltet die von Prokaryonten gebildeten und gegen diese gerichteten Verbindungen. Dazu gehören u.a. Antibiotika und Bakteriocine. Bakteriocine sind im Gegensatz zu den Antibiotika Proteine, die in der Regel als einzelne Polypeptidketten Bakterien derselben Gruppe abtöten. Sie werden von vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gebildet (70/89).

Am besten untersucht sind die von Escherichia coli produzierten Bakteriocine, die Colicine (45/36). Die Molekulargewichte der Colicine reichen von 4 k für Colicin V (28) bis zu über 90 k für Colicin D (90). Um ihre Wirkung zu entfalten müssen sie aus der Produzentenzelle ausgeschleust werden und in die Zielzelle eindringen. Für ihre Aufnahme muß es spezifische Transportsysteme geben, die bisher nicht aufgeklärt wurden. Es wurde jedoch gezeigt, daß Rezeptoren dazu notwendig sind (7/45). Diese Rezeptoren sind Proteine in der äußeren Membran, die von Escherichia coli exprimiert werden als Teile von spezifischen Aufnahmesystemen. Zur weiteren Translokation, d.h. zur Ablösung vom Rezeptor und damit zum Weitertransport in die Zelle, ist bei einem Teil der Colicine noch das tonB-Genprodukt notwendig. Die tonB abhängigen Colicine werden in der B-Gruppe zusammengefaßt (21/35/45).

Bezüglich der Wirkungsweise der Colicine lassen sich solche mit enzymatischer Aktivität in der Zielzelle und porenbildende Colicine unterscheiden. Enzymatischaktive

Colicine sind z.B. Colicin E2 (80), welches als DNase in sensitiven Zellen das Bakterienchromosom abbaut oder Colicin E3 (4), das die Proteinbiosynthese blockiert, indem es ca. 50 Nukleotide vor dem 3'-Ende der 16S-rRNS einen Schnitt setzt. Porenbildner sind die Colicine A (44/18), B ( ), E1 (18), Ia (44), Ib (92) und K (84). Durch die Bildung eines Membrankanals in der Cytoplasmamembran führen sie zum Zusammenbruch des Membranpotentials. Wenige Moleküle eines Colicins reichen aus, um eine Zelle abzutöten (43/81).

Die Colicinproduzenten schützten sich gegen das eigene Colicin durch die gleichzeitige Synthese eines Immunitätsproteins (28/30/31/46/47/59/67/68/94). Bei den Colicinen mit enzymatischer Aktivität wird das Colicin zusammen mit dem Immnuitätsprotein als 1:1 Komplex ausgeschieden (40/97). Bei den colicinogenen Stämmen, die Porenbildner produzieren und bei denen die Ergebnisse dazu schon vorliegen, findet man das Immunitätsprotein am Wirkort des Colicins, in der Cytoplasmamembran (30/47/67/94). Die Immunitätsproteine haben Molekulargewichte zwischen 9 k und 20 k (46/47). Insensitiv gegen ein bestimmtes Colicin ist Escherichia coli immer dann, wenn ihm der entsprechende Rezeptor fehlt. Man spricht dann von Resistenz. Toleranz gegen ein Colicin kann zwei Ursachen haben: Entweder ist der Wirkort so verändert, daß das Colicin dort seine Wirkung nicht mehr ausüben kann, oder es bindet zwar an den Rezeptor, gelangt aber nicht bis an den Wirkort. Meist ist die Toleranz jedoch nicht spezifisch gegen ein Colicin gerichtet, sondern die Folge einer Mutation mit pleiotrophem Effekt (53/61/62).

Die Aktivität eines Colicins, seine Adsorption an den Rezeptor und seine Translokation in die Zelle konnten drei Abschnitte der Polypeptidkette zugeordnet werden. Diese Anordnung in Funktionsdomänen wurde bei den Colicinen A (19/50), E1 (12), E2 (58), E3 (59/64), M (24) und bei Cloacin DF13 (29) gefunden. Sie scheint ein allgemeines Bauprinzip der Colicine zu sein.

Für die Ausschleusung aus der Produzentenzelle scheint ein weiteres Polypeptid verantwortlich zu sein, welches der colicinogene Stamm ebenfalls exprimiert. Dieses Kill- oder Lyseprotein wird, soweit bekannt, als Proform synthetisiert. Die bekannten Lyseproteine haben als Proform ein Molekulargewicht von ca. 5 k und als reife Form von ca. 2,5 k (16/41/98).

Die Colicine sind stets Plasmid-codiert. Dabei handelt es sich meist um große konjugative Plasmide, die daneben noch oft Virulenzfaktoren, Eisenversorgungssysteme, Toxine, Adhaerenz an Gewebe und Invasivität determinieren. Die Reihenfolge ist immer Aktivitätsgen, Immunitätsgen und Lysegen. Bei den enzymatischaktiven Colicinen werden alle drei Gene, beginnend mit dem Aktivitätsgen in dieselbe Richtung transcribiert und bilden ein Operon (51/52/60). Es wird eine polycistronische mRNS gebildet, die meist nur die ersten beiden Gene und selten noch das Lysegen umfasst. Sowohl nach dem Immunitätsgen als auch nach dem Lysegen finden sich Terminationssignale für die Transcription (16). Bei den porenbildenden Colicinen hat das Immunitätsgen einen eigenen Promotor und es wird antiparallel zu den beiden anderen Genen transcribiert (13/47).

Für das Aktivitäts-Lyse-Operon von Colicin E1 findet man wieder zwei Transcriptions-Terminatoren, einen davon nach dem Aktivitätsgen, den anderen nach dem Lysegen (13). Die meisten Colicine sind durch Mitomycin C induzierbar. Durch solch eine Induktion werden in beiden Colicin-Gruppen auch die Lysegene stark exprimiert. Die Folge davon ist, daß die Zellen lysieren (16/41/98).

Colicin M wurde zuerst definiert auf der Basis einer Kreuzresistenz von Escherichia coli Stämmen zwischen Colicin M und den Phagen T5 und T1 (26). Dies beruht darauf, daß alle drei Agenzien an denselben Rezeptor adsorbieren. Dieser Rezeptor ist FhuA (10/11). Er wird daneben noch von dem Phagen Ø80, dem Antibiotikum Albomycin und dem Eisenchelator Ferrichrom benutzt. Neben dem Rezeptorgen fhuA sind weitere chromosomale Gene für die Wirkung von Colicin M notwendig. Für die Aufnahme sind dies tonB, welches auch für die Aufnahme der Colicine der B-Gruppe, sowie von allen Eisenkomplexen und von Vitamin B12 benötigt wird (5/6). Dasselbe gilt für das Gen exbB. exbC ist ebenfalls essentiell für die Colicin M-Aufnahme und den Transport von Eisenkomplexen in die Zelle. Ungeklärt ist dabei die Funktion von tolM, das mutiert Toleranz gegen Colicin M verleiht und bei rpsL codiert.
Isoliert wurde Colicin M zunächst aus dem Stamm 32T19F, der nur Colicin M produziert. Die Produktion war durch Mitomycin C nicht induzierbar. Größere Mengen reinen Colicins konnten aus dem Stamm C1139, der auch Colicin B produziert, isoliert werden. Durch Mitomycin C-Induktion konnte die Colicin-Produktion bis auf das 1000fache gesteigert werden. Auf Grund seines stark basischen

Charakters konnte das 26 k große Protein relativ leicht gereinigt werden (81). Durch Proteinase K-Spaltung wurden zwei Bruchstücke erhalten. Das 24 k große Bruchstück entsprach dem carboxy-terminalen Ende und schützte Zellen vor Colicin M und gegen den Phagen T5, war ansonsten aber gegen ganze Zellen wie auch das kleine Bruchstück biologisch inaktiv. Durch osmotische Schockbehandlung in das Periplasma gelangt tötete es mehr Zellen ab als gleiche Mengen intakten Colicins. Das kleine, 3 Kilodalton große Bruchstück, entsprach dem aminoterminalen Ende des Colicins. Diese Daten wurden als Belege dafür genommen, daß auch Colicin M in Funktionsdomänen gegliedert ist (24). Der aminoterminale Teil ist danach für die Translokation in die Zelle, der carboxyterminale Bereich für die Aktivität und der zentrale Abschnitt für die Adsorption an den Rezeptor verantwortlich. Einen Sonderfall unter den Colicinen stellt Colicin M insoweit dar, daß es als einziges direkt zur Lyse der sensitiven Zellen führt. Dies wird durch die Hemmung später Schritte in der Mureinsynthese erreicht (83). Unter osmotischem Schutz entstehen dabei Zellformen, wie sie durch die Einwirkung von ß-Lactamantibiotika bekannt sind (9). Diese Wirkung tritt aber nicht ein, wenn die Kopplung zwischen Rezeptor und dem Energiemetabolismus der Cytoplasmamembran durch eine Mutation in tonB unterbrochen ist, oder wenn die Zellen Energie gehungert sind (6). Die Abtötung der Zellen wird außerdem nur erreicht, wenn Colicin M kontinuierlich bis zum Eintritt der Lyse (ca. 20 Minuten) einwirken kann (81). Zur Colicin M-Wirkung sind zudem Ca^{2+}-Jonen notwendig (81). Während Colicin M-tolerante

Mutanten (6/82), auch in osmotischen Schockexperimenten unempfindlich gegen Colicin M bleiben, wird *in vitro* die Mureinsynthese dieser Mutanten durch Colicin M gehemmt (83).

In dieser Arbeit sollte die Colicin M-Region aus pColBM-Cl139 kloniert werden. Dadurch sollte aufgeklärt werden, ob auch die Colicin M-Region Gene für die Immunität und für die Ausschleusung des Colicins determiniert. Durch Restriktionskartierung, auch von Insertionsmutanten, sollte dann die Lage und Anordnung der Gene zueinander bestimmt und die Genprodukte identifiziert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemicalien

Alle hier nicht aufgeführten verwendeten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma E. Merk, Darmstadt.

Amersham Bucheler	^{14}C-Aminosäuren
	^{35}S-Methionin
	^{35}S-dATP
	^{14}C-Proteinstandards
	Sequenzier-"Kit"
	DNS-gesteuertes Translations-"Kit"
Biolaps	15 Bp-"Primer"
Boehringer	Nukleotide: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP
	Restriktionsendonukleasen:
	AvaI, BamHI, BglI, ClaI, DraI, EcoRI,
	HaeIII, HindII, HindIII, HpaII, PstI,
	SalI, Sau3A, SphI, TaqI
	RNase
	T4-DNS-Ligase
BRL	HGT-Agarose
	LM-Agarose
	"Ultra pure" Harnstoff
Difco	Bacto-Agar
	Bacto-Trypton
	Hefe-Extrakt
LKB	Binde-Silan
	Repel-Silan
NEN	"Enlightening"

Serva	Acrylamid
	Ammoniumpersulfat
	Bisacrylamid
	Bromphenolblau
	Chloramphenicol
	ß-Mercaptoäthanol
	Polyäthylenglycol 6000
	SDS
	TMED
	Triton X-100
Sigma	Ampicillin
	Dithiothreithol
	Ethidiumbromid
	Lysozym
	Spectinomycin
	Tetracyclin

Das Colicin M-Präparat stammte von Herrn Dr. Dreher. T5 Phagenisolate wurden von Frau Krauel und Herrn Dr. Heller zur Verfügung gestellt.
Colicin B wurde von Herrn Dr. Hantke und Herrn Schramm isoliert.

2.1.2. Nährmedien und Puffer

TY-Medium:	Bacto-Trypton	10g
	Hefe-Extrakt	5g
	NaCl	5g
	Mit dejonisiertem Wasser auf 1l auffüllen.	
M9-Salzlösung (10x):		
	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	75g
	KH_2PO_4	30g
	NaCl	5g
	NH_4Cl	10g
	Mit dejonisiertem Wasser auf 1l auffüllen.	

M9-Medium:

Entjonisiertes Wasser	900ml
M9-Salzlösung (10x)	100ml
Glucoselösung (40%)	10ml
$MgSO_4$-Lösung (1M)	1ml
$CaCl_2$-Lösung (0,1M)	1ml

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurden 15g/l Bacto-Agar zugegeben, zur Herstellung von Top-Agar pro 1l Medium 6,5g Bacto-Agar.
Medien mit Antibiotika: Pro 1 flüssigem Medium wurden 10mg Tetracyclin, 25mg Ampicillin und 20mg Chloramphenicol bzw. 20mg Tetracyclin, 50mg Ampicillin und 25mg Chloramphenicol pro 1 Festmedium zugegeben.

TE-Puffer:

Tris-HCl	10mM
EDTA	1mM
pH8	

TE gesättigtes Phenol:

Phenol	100g
Hydroxychinolin	139mg

Soviel TE-Puffer zugeben, daß sich nachdem das Phenol in Lösung gegangen ist, zwei Phasen bilden.

Triton Lysis Mix:

Triton X-100	1ml
0,25M EDTA	25ml
1M Tris-HCl (pH8)	5ml
Entjonisiertes Wasser	63ml

Stamm	genetische Merkmale	Herkunft
TO196	wie JM101, aber pTO196	diese Arbeit
TO197	wie JM101, aber pTO197	diese Arbeit
TO198	wie JM101, aber pTO198	diese Arbeit
TO199	wie JM101, aber pTO199	diese Arbeit
TO200	wie JM101, aber pTO200	diese Arbeit
TO511	wie JM101, aber pTO511	diese Arbeit
TO635	wie JM101, aber pTO635	diese Arbeit
TO639	wie JM101, aber pTO639	diese Arbeit
T344	wie H1443, aber pTO195::Tn1000(*cmi*$^+$)	diese Arbeit
T345	wie H1443, aber pTO195::Tn1000(*cmi*)	diese Arbeit
T349	wie H1443, aber pUC8::Tn1000	diese Arbeit
T3412	wie H1443, aber pTO195::Tn1000(*cmi*)	diese Arbeit
T34195	wie H1443, aber pTO195::Tn1000(*cmi*$^+$)	diese Arbeit

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	wichtige genetische Merkmale	Herkunft
C1139	pColBM-C1139, leu lac thi λ^r	Gutermann
K166UB/84	pF166::TnA(ColBM), cys met trp	Fredericq
Hb101	recA hsdM hsdR supE lacY leu thi pro	Collins
DS410	minA minB lacY xyl thi mtl rpsL	Dougan, Sherratt
RK5016	argH btuB recA	Kadner
CR63	Wildtyp, F^+	dieses Institut
H1443	F^-, aroB lac araD rpsL	Hantke
H1605	mal tet^r	Hantke
JM101	Δlacpro thi supE F'traD36 proAB $lacI^qZ\Delta M15$	Messing
IR20	aroB tsx malT thi fepA	dieses Institut
P8	aroB tsx malT thi fhuA	dieses Institut
BR158	aroB tsx malT thi tonB	dieses Institut
TO163	wie Hb101, aber pTO163	diese Arbeit
TO2	wie Hb101, aber pCE2	diese Arbeit
TO4	wie Hb101, aber pTO4	diese Arbeit
TO6	wie Hb101, aber pPE6	diese Arbeit
TO195	wie Hb101, aber pTO195	diese Arbeit

2.1.4. Restriktionskarten der benutzten Plasmidvektoren und Transposonen

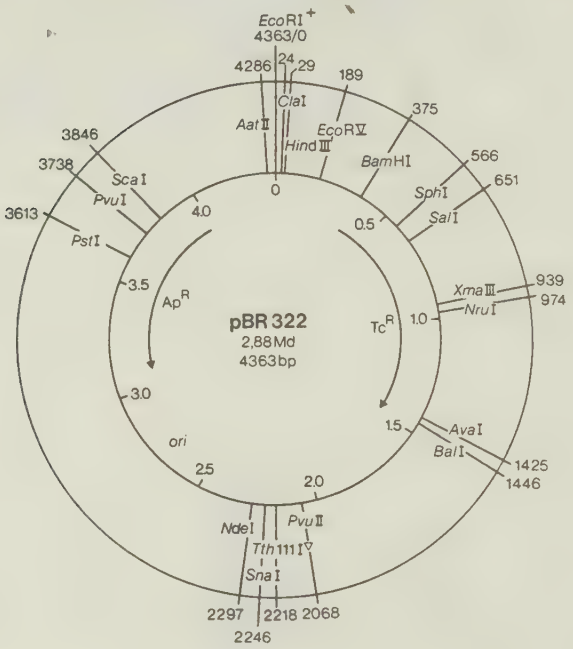

Abb. 1: Restriktionskarte von pBR322 (88)

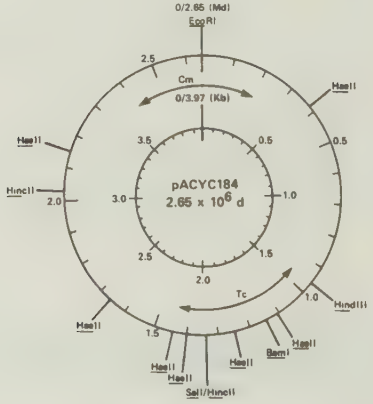

Abb. 2: Restriktionskarte von pACYC184 (14)

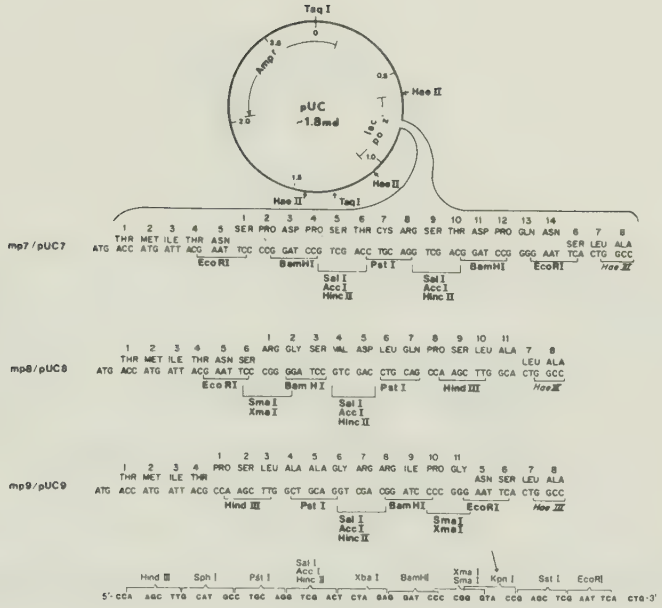

Abb. 3: Restriktionskarten von pUC7, pUC8, pUC9 und pUC19 (93)

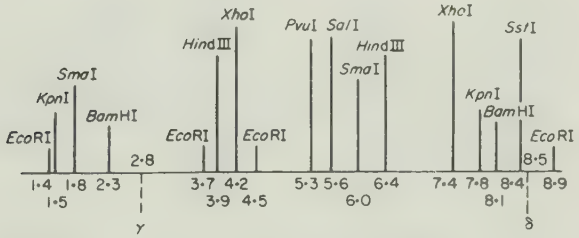

Abb. 4: Restriktionskarte von Tn1000 (33)

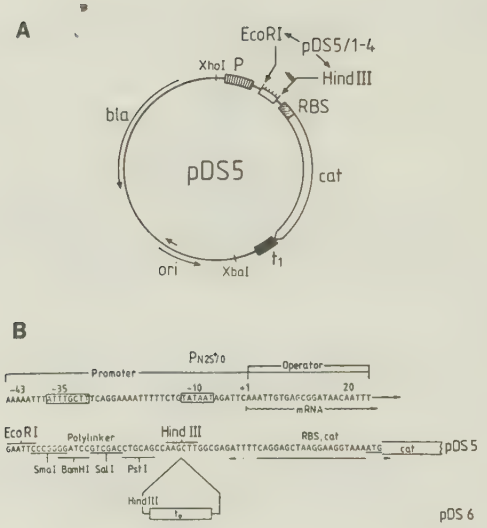

Abb. 5: A: Genetische und physikalische Karte von pDS5 und pDS6

B: Promotor- Operator-und Polylinkersequenz (87)

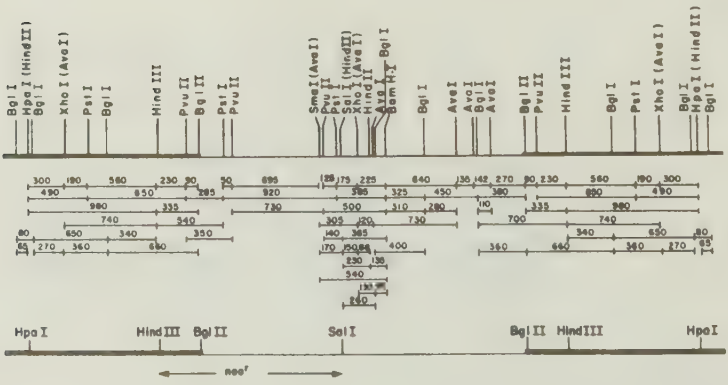

Abb. 6: Restriktionskarte von Tn5 (73)

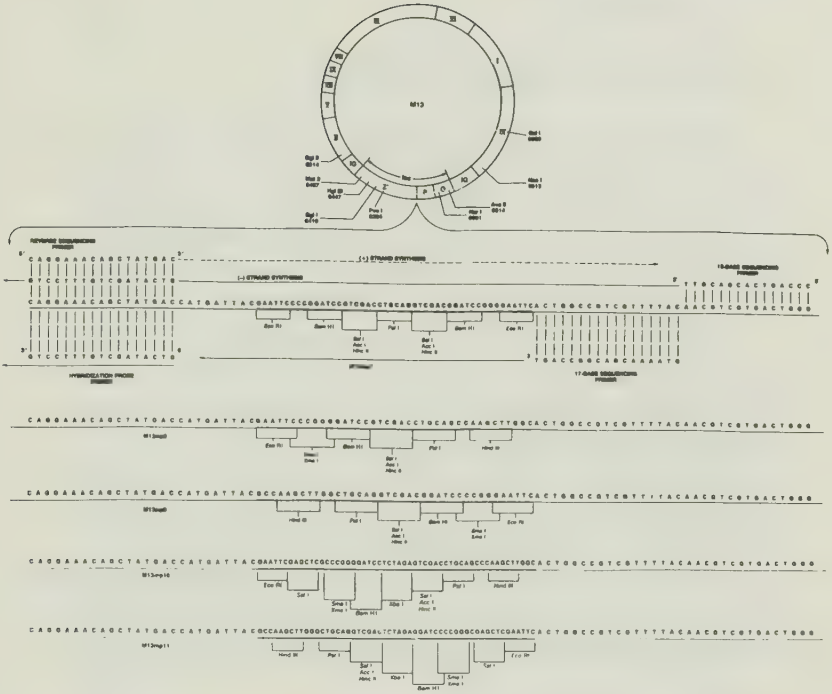

Abb. 7: Restriktionskarten der M13 Phagen mp 7, mp8, mp9 mp1o und mp11 (56)

2.2. METHODEN

2.2.1. Kultivierungsbedingungen

Auf Agarplatten, wenn möglich mit einem Selektivmedium, wurden die einzelnen Stämme bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurden sie anschließend im Kühlraum aufbewahrt. Für Vorkulturen oder zur Schnellisolierung von Plasmiden aus vielen Stämmen wurden 3ml eines flüssigen Selektivmediums jeweils mit dem entsprechenden Stamm angeimpft. Die 10ml fassenden Röhrchen mit den Kulturen wurden im Wasserbad bei 37°C und ausreichender Belüftung über Nacht inkubiert.
Hauptkulturen wurden mit dem entsprechenden Volumen an Vorkultur auf eine OD_{578} von 0,1 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und guter Belüftung. Geerntet wurden die Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen, entsprechend der geplanten Verwendung. Eine OD_{578} von 0,8 entsprach ungefähr einem Titer von 10^8 Zellen pro ml.

2.2.2. Plasmidisolierung

2.2.2.1. Schnelle Isolierungsmethode für kleine Plasmidmengen aus vielen Stämmen (2)

1,5ml einer über Nacht inkubierten Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden sedimentiert durch Zentrifugation für 15 Minuten. Der Überstend wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt. Das Sediment resuspendierte man in 0,1ml einer Lösung aus Glucose(50mM), CDTA(10mM), Lysozym(1mg/ml) und Tris-HCl(25mM, pH8). Diese Suspension blieb für 5 Minuten auf Eis.

Dann wurden 0,2ml einer Lösung aus NaOH(0,2N) und SDS(1%) dazugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde wieder für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nun wurden 0,15ml einer Lösung aus Kaliumacetat(3M) und Formiat(1,8M) dazupipettiert. Nach 15 Minuten auf Eis hatte sich ein weißer Niederschlag gebildet. Dieser wurde durch Zentifugation für 2 Minuten sedimentiert. 0,35ml des Überstands überführte man in ein neues Reaktionsgefäß mit 0,9ml eiskaltem Äthanol und durchmischte gut. Die DNS wurde in 15 Muniten bei -20°C gefällt. Dann wurde für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 0,1ml einer Natriumacetat(0,1M) und MOPS(50mM) beinhaltenden Lösung resuspendiert. Erneut wurde bei -20°C die DNS gefällt mit 0,2ml Äthanol. Nach Zentrifugieren und Trocknen im Exikkator wurde das Sediment in 50µl einer CDTA(1mM), Tris-HCl(10mM, pH7,5)-Lösung gelöst.
Die DNS wurde bei -20°C aufbewahrt und konnte zur Restriktion, Ligation und Transformation verwendet werden.

2.2.2.2. Schnelle präparative Methode (2)

In 1l Medium in einem 2l Kolben mit Schikane wurde der jeweilige Stamm bis zu einer OD_{578} von 1 angezogen. Dann wurden 200mg/l Chloramphenicol dazugegeben. Vermittelte das zu isolierende Plasmid Resistenz gegen Chloramphenicol wurde statt dessen 100mg/l Spectinomycin zugegeben. Dies diente jeweils der Amplifikation des Plasmids. Die Inkubation wurde anschliessend über Nacht fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in 0,5l Bechern bei 6000g für 10 Minuten und bei 4°C geerntet. Anschließend wurden sie mit 50ml Wasser gewaschen. Das erhaltene Sediment

wurde soweit möglich zunächst in 1ml und dann in weiteren 9ml einer Lösung aus Glucose(50mM), CDTA(10mM), Lysozym(1mg/ml) und Tris-HCl(25mM, pH8) resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt. 20ml einer alkalischen SDS-Lösung(0,2N NaOH, 1% SDS) wurden zugegeben. Das Mischen erfolgte durch mehrmaliges Stülpen des Bechers. Nach 10 Minuten auf Eis wurden 15ml einer hochkonzentrierten Salzlösung(3M KAc, 1,8M Formiat) dazugegeben. Auf dem Vortex wurde gemischt. Zur Ausbildung eines Präzipitats wurde die Mischung für 30 Minuten auf Eis stehengelassen. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 12000g für 10 Minuten und bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen eiskalten Äthanols bei -20°C innerhalb von 20 Minuten gefällt. Das nach Zentrifugieren erhaltene Sediment wurde in 5ml einer Acetat-MOPS-Lösung(NaAc 0,1M, MOPS 50mM, pH8) aufgelöst. Dann wurde noch einmal mit dem doppelten Volumen an Äthanol gefällt und anschließend in 2ml Wasser resuspendiert. Dasselbe Volumen einer LiCl-Lösung(LiCl 5M, MOPS 0,05M, pH8) wie das der erhaltenen DNS-Lösung wurde zugegeben. Nach 15 Minuten bei 0°C hatte sich ein Niederschlag gebildet, der durch Zentrifugation bei 12000g und 0°C in 10 Minuten sedimentiert wurde. Der klare Überstand wurde für 10 Minuten auf 60°C erhitzt. Nochmaliges Zentrifugieren beseitigte einen erneut aufgetretenen Niederschlag. Zum Überstand wurden 10µg RNase, die zuvor für 10 Minuten gekocht wurde, zugegeben. Nach Inkubation für weitere 10 Minuten bei 37°C wurden 10µg Proteinase K zugesetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Raumtemperatur wurden dann 40µl 10% SDS, 2ml der Acetat-MOPS-Lösung und tropfenweise 4ml Isopropanol zugegeben.

Nach weiteren 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde bei 20°C für 15 Minuten bei 12000g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2ml der Acetat-MOPS-Lösung aufgenommen und wieder mit Äthanol innerhalb von 15 Minuten gefällt. Die gefällte DNS wurde in 1ml TE-Puffer resuspendiert und zweimal mit TE-Puffer-gesättigtem Phenol extrahiert. Die DNS-haltige Phase wurde mit Äthanol versetzt, die DNS gefällt und mit 1,5ml Äthanol(70%) gewaschen. Das Sediment wurde im Exikkator getrocknet und in 1ml TE-Puffer gelöst. Die DNS wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3. Präparative Methode mit Reinigung der DNS mittels CsCl-Gradientenzentrifugation (91)

In einem 2l Kolben mit einer Schikane wurden in 1l Medium die Zellen bis zu einer OD_{578} von 1 angezogen. Dann erfolgte die Zugabe von 200mg/l Chloramphenicol, falls das zu isolierende Plasmid nicht für die Chloramphenicol-Transacetylase codierte. War letzteres der Fall wurde statt dessen Spectionomycin (100mg/l) dazugegeben. Anschließend wurde über Nacht weiterinkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 6000g geerntet. Das Sediment wurde mit 30ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde es in 10ml kalter Saccharose(25%) aufgelöst. Zur Lyse der Zellen wurden 2ml Lysozym-Lösung(5mg/ml), 100ug RNase, die zuvor für 10 Minuten gekocht wurde, sowie 4ml EDTA-Lösung(0,25M, pH8) zugegeben. Die Mischung wurde für 10 Minuten auf Eis gestellt. Als nächstes wurden 16ml Triton-Lysis-Mix zupipettiert. Nach leichtem Schütteln wurde wieder für 5 Minuten auf Eis gestellt. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 4°C für eine Stunde im SS34 Rotor bei 18000 UpM wurden ganze Zellen, Zelltrümmer,

chromosomale DNS und große Teile der RNS sedimentiert. Der Überstand wurde einmal mit wässrigem Phenol und zweimal mit Isoamylalkohol extrahiert. Zum verbliebenen Überstand wurde 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung(2,5M) und das doppelte Volumen eiskaltes Äthanol gegeben. Damit wurde die DNS über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Morgen wurde die DNS im SS34 Rotor bei -20°C und 10000 UpM innerhalb von 45 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Plasmid-DNS im Exikkator getrocknet. Danach wurde die DNS in 8ml einer CsCl-Lösung(1g CsCl pro 1ml TE-Puffer) aufgelöst, in verschweißbare Röhrchen gefüllt, 0,5ml einer Ethidiumbromid-Lösung(5mg/ml) zugegeben und mit der CsCl-Lösung aufgefüllt bis fast an den unteren Rand der Einfüllöffnung. Nachdem vorhandene Ungleichgewichte austariert worden waren, wurden sie zugeschweißt. Durch Stülpen wurde gemischt bis eine einheitliche Phase entstanden war. Die Abtrennung der Plasmid-DNS von chromosomaler DNS und RNS erfolgte durch Zentrifugation im 75Ti Rotor bei 20°C und 50000 UpM für mindestens 40 Stunden. Es wurden in der Regel zwei Banden erhalten, die im Tageslicht gut zu erkennen waren. Die untere repräsentierte die Plasmid-DNS. Diese wurde durch seitliches Anstechen mit der Kanüle einer Spritze und Absaugen isoliert. Damit während des Absaugens keine Luft neben der Kanüle eindringen konnte, welche den Gradienten durch aufsteigende Blasen zerstört hätte, wurde im oberen Teil des Röhrchens ebenfalls eine Kanüle eingestochen. Das Ethidiumbromid wurde aus der Plasmid-haltigen Phase mittels Isopropanol entfernt. Das dazu verwendete Isopropanol war zuvor mit CsCl-gesättigtem TE-Puffer geschüttelt worden. Um das Cäsiumchlorid zu entfernen, wurde für 24 Stunden im Kühlraum gegen

je 0,5l TE-Puffer dialysiert. Der Puffer wurde dabei mindestens 8 mal gewechselt. Zur Dialyse wurde die Plasmid-Lösung auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, deren Deckel mit einem Korkbohrer perforiert worden und die entstandene Öffnung mit einem Stück Dialysemembran wieder verschlossen worden war. Nach einer letzten Äthanolfällung wurde im Exikkator getrocknet und die DNS in 1ml TE-Puffer aufgenommen. Die Isolate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3. Bestimmung der DNS Konzentration

Die DNS Konzentration von Proben, die hochgereinigt waren (nach 2.2.2.2. oder 2.2.2.3.), wurde photometrisch durch Messen der Extinktion bei 260nm bestimmt. Dazu wurde die Formel benutzt:

$OD_{260} \times 50 =$ µg DNS/ml

2.2.4. Schneiden von Plasmid-DNS mit Restriktionsenzymen

Die verwendeten Restriktionsenzyme ließen sich in drei Gruppen einteilen, entsprechend den Pufferbedingungen für eine optimale Spaltung der DNS. Diese Inkubationspuffer hatten folgende Zusammensetzungen:

a) niedrige Salzkonzentration
   10mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, pH7,5
   Die Enzyme dazu waren: ClaI, DraI, HpaII, TaqI
b) mittlere Salzkonzentration
   10mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 50mM NaCl, pH7,5
   Die Enzyme dazu waren: AccI, AvaI, BamHI, BglII, HaeIII, HindII, HindIII, PstI, Sau3A, SphI

c) hohe Salzkonzentration

50mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 100mM NaCl, pH7,5

Die Enzyme dazu waren: EcoRI, SalI

Meistens wurden 1-2µg DNS mit 5 Einheiten Restriktionsendonuklease in 20µl Gesamtvolumen für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Spaltungen mit TaqI wurden bei 65°C durchgeführt. Spaltungen mit AccI nur mit hochgereinigter DNS über Nacht.

Größere Mengen DNS bei gleicher Anzahl an Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNS wurden verwendet, wenn ein Restriktionsfragment anschließend aus dem Agarosegel isoliert werden sollte. Das Gesamtvolumen musste dabei stets so vergrößert werden, daß die eingesetzten µl Restriktionsenzym höchstens ein Zehntel des Gesamtvolumens ausmachten. Sollten Restriktionsfragmente in "niedrigschmelzender" Agarose gespalten werden, so wurde die Agarose bei 65°C geschmolzen und anschließend alle Arbeiten damit bei 37°C durchgeführt.

Partielle Spaltungen wurden erreicht, indem verschiedene Verdünnungen eines Restriktionsenzyms verwendet wurden.

Sollte eine Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen durchgeführt werden, so wurden beide Enzyme gleichzeitig zugesetzt, sofern sie dieselben Restriktionspuffer benötigten. War dies nicht der Fall, wurde zuerst das Enzym zugesetzt, welches die niedrigere Salzkonzentration beanspruchte. War die Inkubation damit beendet, wurde das Enzym mit dem Anspruch auf höhere Salzkonzentration eingesetzt, nachdem die entsprechende Konzentration eingestellt worden war.

Die Enzymreaktion wurde durch Erwärmen auf 65°C für

10 Minuten abgebrochen. Bei dem Enzym TaqI war dies zwar nicht möglich, aber auch nicht notwendig, da es bei der üblichen Ligationstemperatur von 12°C keine Aktivität mehr entfaltete. Die Enzyme wurden nicht inaktiviert, wenn eine Ligation von DNS-Stücken anschließend erfolgen sollte, die durch Spaltung mit verschiedenen aber kompatiblen Enden erzeugenden Enzymen entstanden waren. In einem solchen Fall kann nämlich die Sequenz der Ligationsstelle von keinem der eingesetzten Enzyme wieder gespalten werden. Auf diese Weise wurde erreicht, daß trotz Spaltung des Vektors mit nur einem Enzym, und zwar mit einem anderen wie die zu klonierende DNS, dieser in der Regel nur mit einem Stück Fremd-DNS religiert wurde. Zur Kontrolle der Spaltung und zwecks Restriktionskartierung wurde jeweils 1/3 des Gesamtvolumens der Probe an Auftragspuffer(5% Fikoll, 0,2% Bromphenolblau) dazu pipettiert. Wurden Plasmide geschnitten, die nach der Schnellmethode 2.2.2.1. isoliert worden waren, so wurde 5 Minuten vor der Zugabe des Auftragspuffers 1µg RNase zugegeben. Deren DNase-Verunreinigung wurde durch Kochen für 10 Minuten inaktiviert.

2.2.5. Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Restriktions-Fragmenten erfolgte zur Größenbestimmung oder zur Isolierung bestimmter Fragmente.
Dazu verwendet wurden Flachbettelektrophoreseapparaturen der Firma Bethesda Research Laboratories, Inc. Rockville, USA. Es waren die Modelle H4(groß), H5(mittel) und H6(klein). Als Elektrophoresepuffer wurde entweder TEA-Puffer(10mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH8) oder TBE-Puffer(10,8g Tris, 5,5g Borsäure, 0,9g EDTA,

jeweils pro l verwendet. Die Agarosekonzentrationen wurden variiert zwischen 0,5% und 2%, je nach Größe der Restriktions-Fragmente.
Zum Anfärben der DNS wurde unter die noch flüssige Agarose vor dem Gießen des Gels 0,2µg/ml Ethidiumbromid gemischt. Die Elektrophorese niedermolekularer DNS erfolgte in dem Modell H6 bei 50 bis 70 Volt für ca. eine Stunde. 100 bis 170 Volt für 1 bis 2 Stunden wurden für die Elektrophorese in der Midigelapparatur(Modell H5), 150 bis 200 Volt während 1 bis 4 Stunden für die Elektrophorese in Modell H4, angelegt. Elektrophoresen über Nacht bei 30 bis 40 Volt konnten mit dem Modell H4 ebenfalls durchgeführt werden.
Zur Isolierung von Restriktions-Fragmenten wurden u.a. Gele aus "niedrigschmelzender" Agarose hergestellt. Das Gießen dieser Gele, als auch die Elektrophorese selbst, wurde im Kühlraum vorgenommen.
Nach der Elektrophorese wurde die DNS auf einem UV-Transilluminator der Firma Ultraviolett Produkts, San Gabriel, California, USA, sichtbar gemacht. Photographiert wurde mit einer Polaroid MP-4 Land Camera bei Blende 8 und einer Belichtungszeit von 60 bis 90 Sekunden. Der verwendete Film war ein Polaroid Positiv-Negativ Film Typ 665.

2.2.6. Größenbestimmung von Restriktionsfragmenten

Um die Größenbestimmung durchführen zu können, wurden Molekulargewicht-Standards verwendet. Dies waren die Spaltstücke der λ-DNS nach HindIII-Verdau oder die Fragmente des pUC19 Plasmids nach Spaltung mit HaeIII. Letztere wurden für die Größenbestimmung von Fragmenten unter 1kB eingesetzt.

Die λ-HindIII-Fragmente haben folgende Molekulargewichte in kB (78):
23,130/ 9,416/ 6,682/ 4,361/ 2,322/ 2,027/ 0,564/ 0,125

Für die pUC19-HaeIII-Fragmente werden folgende Molekulargewichte (in Bp) angegeben (96):
587/ 458/ 434/ 296/ 267/ 257/ 174/ 102/ 80/ 18/ 11

Für jedes Gel wurde eine Eichkurve aufgestellt, indem die Laufstrecken auf der Abszisse arithmetisch, die Molekulargewichte der Fragmente auf der Ordinate logarithmisch aufgetragen wurden.

2.2.7. Isolierung von Restriktionsfragmenten aus Agarose

Sollte ein Restriktionsfragment aus Agarose isoliert werden, so wurde die DNS durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht sichtbar gemacht. Dann wurde die Bande mit einem Skalpell möglichst exakt ausgeschnitten. Anschließend wurde das Agarosestück mit dem Kolben einer 1ml Spritze zerkleinert, wenn das Gel mit "hochschmelzender" Agarose zubereitet worden war. War "niedrigschmelzende" Agarose verwendet worden, so wurde sie bei 65°C geschmolzen. Dann wurde das gleiche Volumen TE-Puffer-gesättigtes Phenol zugegeben und auf dem Vortex kräftig gemischt. Nach mindestens 15 Minuten bei -70°C wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Phenolphase einmal mit ca. 100µl TE-Puffer extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden zweimal mit Phenol extrahiert. Nach Zugabe von 2/1 Volumen eiskaltem Äthanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat wurde für 15 Minuten bei -20°C die DNS gefällt. Sie wurde sedimentiert durch zehnminütige Zentrifugation.

Das Sediment wurde mit Äthanol(70%) gewaschen, getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

2.2.8. Bedingungen für die Ligation (49)

Die DNS-Konzentrationen betrugen im Ligationsansatz 50µg bis 200µg/ml. Die Ligation erfolgte meist in einem Volumen von 10µl, selten von 30µl und die Pufferbedingungen waren wie folgt:
50mM Tris-Hcl, 10mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 5mM DTT, 50µg/ml Rinderserumalbumin, pH7,5
Die Ligation wurde bei 12°C über Nacht durchgeführt und durch Zugabe von 0,5 bis 1 Einheit T4-DNS-Ligase gestartet. Für die Ligation von DNS mit glatten Enden wurden 5 bis 10 Einheiten hochkonzentrierter Ligase und Polyäthylenglycol 6000 in einer Konzentration von 6% zugesetzt. Ligationen unter diesen Bedingungen erfolgten bei 4°C.
Sollten bestimmte Restriktions-Fragmente gezielt kloniert werden, so wurde die Ligation unter anderen Bedingungen durchgeführt. Um die Verluste an DNS möglichst klein zu halten wurde das zu klonierende DNS-Fragment nicht aus der Agarose isoliert, vielmehr wurde die Ligation direkt in "niedrigschmelzender" Agarose ausgeführt. Das Agarosestück mit dem DNS-Fragment wurde bei 65°C geschmolzen und dann auf 37°C abgekühlt. Der verwendete Ligasepuffer enthielt 50mM Tris-HCL, 10mM $MgCl_2$ und 50µg/ml Rinderserumalbumin, pH7,5. In ein auf 37°C vorgewärmtes Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden pipettiert:
3µl des Ligasepuffers(10x), 0,6µl einer 0,5M DTT-Lösung, 0,2µl einer 0,1M ATP-Lösung, 1µl Vektor(50-100ng), 2µl hochkonzentrierte Ligase(5-10 Einheiten), 3ul destilliertes Wasser und 20µl geschmolzene Agarose.

Inkubiert wurde bei Zimmertemperatur über Nacht. Vor der Transformation wurde wieder für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und dann mit 70µl einer 10mM Tris-HCl-Lösung(pH7,5), die ebenfalls 65°C heiß war, verdünnt.

2.2.9. Transformation (20)

In 50ml TY-Medium wurden die Zellen bei 37°C und guter Belüftung bis zu einer OD_{578} von 0,5 angezogen. Bei 4°C wurden die Zellen durch Zentrifugieren mit 6000g für 5 Minuten geerntet. Nachdem sie mit eiskalter Saline gewaschen worden waren, wurden sie in 20µl eiskaltem Transformationspuffer(10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 75mM $CaCl_2$, pH7) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis gestellt. Dann wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und das Sediment in 5ml eiskaltem Transformationspuffer aufgelöst. Zu 0,3ml Portionen dieser Zellsuspension wurden dann höchstens 0,5µg DNS gegeben. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis wurde für 5 Minuten auf 37°C erwärmt und dann wieder auf Eis gestellt. 30 Minuten später wurde 1ml TY-Medium dazugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Auf Selektivplatten, die unter der "Clean-bench" oberflächlich getrocknet wurden, wurden verschiedene Verdünnungen des Ansatzes ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Transformanten wurden am nächsten Morgen auf Einzelkolonien ausgestrichen, die dann untersucht werden konnten. Dabei wurde getestet, ob der Vektor eine Insertion trägt und nach Isolierung des rekombinanten Plasmids eine Restriktionskarte erstellt. Wurde zudem der erwartete Phänotyp von der Transformanten ausgeprägt, wurde mit dem Plasmid ein zweiter Stamm transformiert und die erhaltenen Transformanten ebenfalls auf den Phänotyp und das rekombinante Plasmid hin untersucht.

2.2.10. Methoden zur Selektion auf oder "Screening" nach Transformanten mit einem rekombinanten Plasmid

Selektioniert wurde entweder auf die vom Vektor vermittelte Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum oder auf die Immunität gegen ein Colicin, sofern auch das entsprechende Immunitätsgen kloniert werden sollte. Wurde auf beide Eigenschaften zugleich selektioniert, so war die Ausbeute an Transformanten mit den gewünschten Eigenschaften bedeutend geringer.
Konnte nicht auf die von der klonierten DNS determinierte Eigenschaft selektioniert werden, so wurde ein Vektor verwendet, mit mindestens zwei Antibiotikaresistenzgenen. Durch Klonierung in eines dieser beiden Gene und den dadurch bedingten Ausfall einer Resistenz, konnten durch den Nachweis der Sensitivität gegen das entsprechende Antibiotikum Klone mit inserierter DNS von nicht rekombinanten unterschieden werden.
Während dazu die Transformanten zunächst auf zwei Agarplatten mit je einem der verschiedenen Antibiotika ausgestrichen werden mußten, konnten durch die α-Komplementation die rekombinanten Klone direkt erkannt werden(32).
Als Vektor wurde einer aus der pUC-Familie verwendet. Mit den damit erhaltenen religierten Plasmiden wurde jeweils der Stamm JM101 transformiert. Die pUC-Vektoren tragen den Promotor und Operator sowie die ersten 8 Tripletts der ß-Galaktosidase, in die im Leseraster noch 11 bis 18 Tripletts, welche als Polylinker fungieren, eingefügt wurden(93). Der Stamm JM101 produziert eine defekte ß-Galaktosidase, die durch das Oligopeptid, exprimiert von pUC, komplementiert wird.

Durch IPTG in den Selektivplatten wird nun die Expression dieses Oligopeptids induziert, die α-Komplementation erreicht und das ebenfalls ins Medium gegebene farblose X-Gal in den blauen Farbstoff Bromchlorindol umgewandelt, der die Klone färbt. Insertionen in den Polylinker reduzieren oder verhindern die α-Komplementation, so daß die rekombinanten Klone farblos bleiben.

2.2.11. Test auf Colicin M-Produktion

Zum Test auf Colicin-Produktion wurden Einzelkolonien jeweils auf zwei Platten mittels eines sterilen Zahnstochers ausgestrichen. Der Ausstrich erfolgte auf ca. $1cm^2$, so daß pro Platte 50 Kolonien getestet werden konnten. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen auf je einer Parallelplatte durch Chloroformdämpfe lysiert. Nach dem Abdampfen der Chloroformreste wurden die lysierten Zellen mit 3ml TY-Topagar überschichtet, der ca. 10^8 Indikatorbakterien enthielt. Zum Test auf Colicin M-Produktion wurde der *fepA* Stamm IR20 und zum Test auf Colicin B-Produktion der *fhuA* Stamm P8 verwendet.
Produzierte ein Stamm Colicin, so bildete sich ein klarer Lysehof im sonst trüben Indikatorbakterienrasen. Auf der Parallelplatte an derselben Position stand der Produzent zur weiteren Verfügung.

2.2.12. Test auf Colicin-Immunität

Um rasch viele Stämme auf Colicin-Immunität durchzumustern, wurde auf einer Agarplatte 0,1ml einer Colicin-Lösung auf einem ca. 0,5cm breiten Streifen verteilt. Im Abstand von 3,5cm wurden ebenso 0,1ml einer T5-Phagensuspension oder einer Colicin D-Lösung

ausgebracht, je nachdem ob es sich um einen Test auf Immunität gegen Colicin B oder M handelte. Die zu testenden Stämme wurden quer über beide Streifen ausgestrichen. Dabei wurde immer zuerst der Colicin B oder M-Streifen überstrichen. Colicin M-immune Stämme wuchsen im Bereich des Colicin M-Streifens, nicht aber im Bereich des T5-Streifens. Entsprechendes gilt für Colicin B-immune Stämme.
Um das Ausmaß der Colicin-Immunität zu bestimmen, wurden Auftropftests mit Colicin-Verdünnungen durchgeführt. Dazu wurde der zu testende Stamm in Top-Agar ausplattiert und je 10µl der verschiedenen Colicin-Verdünnungen aufgetropft. Vollimmune Stämme zeigten auch bei unverdünntem Colicin B oder M keinen Lysehof.

2.2.13. Konjugation

Der Donorstamm wurde bis zu einer OD_{578} von 0,5 und der Rezipientenstamm bis zu einer OD_{578} von 1,5 angezogen. Je 1ml wurde abzentrifugiert und in 0,1ml aufgenommen. Donor- und Rezipientenstamm wurden zusammenpipettiert und gut gemischt. Auf eine frische TY-Platte wurde ein steriles Filterblättchen gelegt. Darauf wurde die Zellsuspension gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde das Filterblättchen in ein Röhrchen zu 2,5ml TY-Medium gegeben. Durch Schütteln auf dem Vortex wurden die Zellen vom Filter gelöst. Je 200µl einer Verdünnungsreihe hiervon wurden auf Selektivplatten ausplattiert, die sowohl das Wachstum des Donor- wie des Rezipientenstamms verhinderten. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht konnten die erhaltenen Einzelkolonien auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden.

2.2.14. Tn1000-Mutagenese (34)

Zur Mutagenese mit Tn1000 wurde der F^+-Stamm CR63 mit dem zu mutagenisierenden Plasmid transformiert. Der Rezipientenstamm 1443 erhielt durch die Konjugation mit CR63 Tn1000-vermittelte Kointegrate aus dem F-Plasmid und dem "Multicopy"-Plasmid (33). Selektioniert wurde auf Exkonjuganten mit Resistenzen determiniert vom Rezipientenstamm(rpsL) und dem "Multicopy"-Plasmid. Die Plasmide aus den Exkonjuganten wurden nach Schnellmethode 2.2.2.1. isoliert und nach Spaltung mit PstI durch Agarosegelelektrophorese(2.2.5.) auf Tn1000-Insertionen hin untersucht.

2.2.15. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Acrylamidgelelektrophorese wurden drei verschiedene Gelsysteme verwendet. Grund dafür waren die Schwierigkeiten bei der Identifizierung des Colicin M-Immunitätsproteins. Das zuerst vorgestellte Gelsystem wurde für die Auftrennung und Identifizierung der Proteine verwendet, die von den Aktivitätsgenen von Colicin B und M determiniert wurden. Zur Identifizierung des Immunitätsproteins wurde das dritte Gelsystem eingesetzt. Die Versuche mit Gradientengelen wurden dagegen bald eingestellt, da diese beim Trocknen zu häufig zerrissen.
Für alle Gelsysteme wurden die Apparaturen der Firma BRL, Modell V16-2, verwendet. Die Gele waren 1mm dick, 12cm lang und 17cm breit.
Die Proteine wurden sichtbargemacht durch Färben der Gele für eine Stunde in 45% Methanol, 45% Wasser und 10% Essigsäure mit 1,25g/l Coomasie-Blau und anschliessendes Entfärben in 5% Methanol und 7,5% Eisessig.

2.2.15.1. Acrylamidgelelektrophorese nach Lugtenberg (48)

Die folgenden Angaben beziehen sich auf Gele mit 11% Acrylamid und 0,2% Bisarylamid. Es wurden jedoch auch Gele hergestellt mit 15% oder 18% Acrylamid und entsprechend höheren Bisacrylamid-Konzentrationen.
Nachdem die Apparatur für die Elektrophorese vorbereitet worden war, wurde zunächst das Trenngel gegossen. Dazu wurden 4,7ml einer Acrylamidlösung (44% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), 3,8ml bidestilliertes Wasser, 9,4ml Trenngelpuffer (0,75M Tris-HCl, pH8,8) und 0,38ml SDS (10%) gemischt, entlüftet und die Polymerisation durch Zugabe von 0,46ml Ammoniumpersulfat (1%) sowie 37µl TMED gestartet. Um eine glatte Oberkante des Trenngels zu erhalten wurde es mit Isopropanol überschichtet.Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Dafür wurden 0,63ml einer Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), 2,3ml bidestilliertes Wasser, 3,1ml Gelpuffer (0,25M Tris-HCl, pH6,8) und 65µl SDS (10%) gemischt, entlüftet und die Polymerisation durch Hinzufügen von 155µl Ammoniumpersulfat (1%) und 12,5µl TMED gestartet.
Der Elektrophoresepuffer enthielt Tris (0,025M), Glycin (0,192M) und 0,4% SDS.
Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Auftragspuffer versetzt. Dieser hatte folgende Zusammensetzung: 2% SDS, 10% Glycerin, 5% ß-Mercaptoäthanol und 0,001% Bromphenolblau.
Die Elektrophorese wurde bei 20mA durchgeführt, bis die blaue Front das Gel eben verlassen hatte.

2.2.15.2 Gradienten-Acrylamidgele (37)

Der Gradient im Trenngel reichte von 10% Acrylamid und 0,5% Bisacrylamid bis zu 18% Acrylamid und 0,9% Bisacrylamid.
Bevor das Trenngel mittels eines Gradienten-Mischers gegossen wurde, stellte man zwei verschiedene Gellösungen her. Die eine (10% Acrylamid) setzte sich zusammen aus 2,3ml Acrylamidlösung (44% Acrylamid, 2,2% Bisacrylamid), 2ml Puffer (4,5M Tris-HCl, pH8,8) 0,1ml SDS (10%), 4,2ml bidestilliertes Wasser und 4,2g Harnstoff. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 0,5ml Ammoniumpersulfat (1%) und 5µl TMED gestartet.
Die zweite Gellösung (18% Acrylamid) setzte sich zusammen aus 4,1ml Acrylamidlösung (44% Acrylamid, 2,2% Bisacrylamid), 2ml Puffer (4,5M Tris-HCl, pH8,8) 0,1ml SDS (10%), 2,4ml Saccharose (0,5g/ml) und 4,2g Harnstoff. Ammoniumpersulfat und TMED wurden in denselben Mengen wie zur ersten Gellösung zugesetzt.
Nachdem das Trenngel polymerisiert und das darübergeschichtete Isopropanol entfernt worden war, wurde das Sammelgel gegossen. Es bestand aus 2ml Acrylamidlösung (25% Acrylamid, 0,65% Bisacrylamid), 1ml Puffer (0,67M Tris-HCl, pH6,8), 0,1ml SDS (10%), 6,2ml bidestilliertes Wasser, 0,67ml Ammoniumpersulfat (1%) und 6,6µl TMED.
Der verwendete Auftragspuffer enthielt 10% Saccharose, 0,0625M Tris-HCl (pH6,8), 2% SDS, 1% ß-Mercaptoäthanol und 0,0025% Bromphenolblau.
Der Elektrophoresepuffer war identisch mit jenem unter 2.2.15.1. beschriebenen.

2.2.15.3. Harnstoffgele (39)

Das Trenngel wurde erhalten durch Zusammenpipettieren von 11ml Acrylamidlösung (44% Acrylamid, 0,169% Bisacrylamid), 7,45ml Trenngelpuffer (1,11M Tris, zuerst mit HCl auf pH8,4 und dann mit NaOH auf pH8,7 eingestellt), 9g Harnstoff, 0,25ml SDS (10%), 0,3ml Ammoniumpersulfat (1%) und 0,1ml TMED. Die Konzentration von Acrylamid im Gel betrug 19,3% und jene von Bisacrylamid 0,074%. Mit Isopropanol wurde überschichtet,um eine glatte Oberkante zu erzielen.
Das Sammelgel bestand aus 2,08ml Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,78% Bisacrylamid), 7,15ml Puffer (0,11M Tris-HCl, pH6,8), 4,5g Harnstoff, 125µl SDS (10%) sowie 150µl Ammoniumpersulfat als Starter und 50µl TMED als Katalysator.
Vor dem Auftragen jeder Probe mußte die Geltasche ausgespült werden.
Der verwendete Auftragspuffer sowie der Elektrophoresepuffer wurden bereits unter 2.2.15.1. beschrieben.
Die Elektrophorese wurde mit 20mA durchgeführt und beendet, nachdem die Farbfront 30 Minuten zuvor das Gel verlassen hatte.

2.2.16. Fluorographie

Die entfärbten Gele mit den radioaktiv-markierten Proteinen flottierten für 15 Minuten in Enlightening. Anschließend wurden sie unter Vakuum bei 100°C getrocknet. Die Fluorographie erfolgte in Röntgenfilmkassetten bei Raumtemperatur. Der verwendete Film war vom Typ X-Omat von Kodak. Die Expositionsdauer betrug für ^{14}C-markierte Proteine zwei bis sieben Tage, für ^{35}S-markierte Proteine zwischen 4 Stunden und 48 Stunden.

2.2.17. Expression plasmidcodierter Proteine im Minizellsystem (54)

Der Minizellen produzierende Stamm DS410 wurde mit verschiedenen rekombinanten Plasmiden transformiert. Um die plasmiddeterminierten Proteine nachzuweisen, wurden zunächst Minizellen isoliert, die das rekombinante Plasmid trugen. Dazu wurde der plasmidhaltige Tochterstamm in 300ml TY-Medium, dem 1g/l Glucose zugefügt worden war, über Nacht angezogen. Die Zellen wurden dann geerntet durch Abzentrifugieren mit 6000g für 15 Minuten bei 4°C. Resuspendiert wurden sie in 10ml eiskalter M9-Salzlösung. Je 5ml davon wurden auf einen 30ml umfassenden Saccharosegradienten (10%-30%) geschichtet. Der Saccharosegradient war hergestellt worden, indem eine Saccharoselösung (20%) in 30ml-Portionen aufgeteilt, eingefroren und bei 4°C über Nacht aufgetaut wurde. Die beladenen Gradienten wurden im Sorval HS-4 Rotor für 20 Minuten bei 4000 UpM und 4°C zentrifugiert. Die angereicherten Minizellen bildeten eine unscharfe Bande in der Mitte des Gradienten, während die Maxizellen zum größten Teil sedimentiert waren.
Mit einer Pasteurpipette wurden die Minizellen abgesaugt, vereinigt und 1:1 mit einer M9-Salzlösung verdünnt. Anschließend wurden sie im Sorvall SS-34 Rotor bei 15000 UpM und 4°C in 10 Minuten abzentrifugiert. Das Minizellsediment wurde in 5ml M9-Salzlösung resuspendiert und auf einen neuen Gradienten geladen. Die Reinigung der Minizellen durch die Gradientenzentrifugation wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Minizellen in 1ml M9-Medium aufgenommen. Die Absorption einer 1:100 Verdünnung wurde bei 600 nm bestimmt und die Minizellen so verdünnt, daß sie eine OD_{600} von 2 hatten.

Dies entsprach einem Titer von $2x10^{10}$. Der Anteil der Minizellsuspension, der nicht zur sofortigen Markierung verwendet wurde, konnte bei -70°C für Monate aufbewahrt werden. Dazu wurden die Minizellen mit Glyzerin (40%) im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Zur Markierung der plasmidderminierten Proteine wurden 0,5ml der Minizellsuspension für 60 Minuten bei 37°C in M9-Medium mit 4mM Cycloserin vorinkubiert. Enthielten die DS410-Abkömmlinge ein pUC-Derivat wurde zudem 1mM IPTG zugesetzt. Danach wurde durch Zugabe von 5µCi einer ^{14}C-Aminosäuremischung für 1 Stunde bei 37°C markiert. Statt der ^{14}C-Aminosäuremischung wurde auch ^{35}S-Methionin oder beides zusammen zur Markierung eingesetzt. In der ^{14}C-Aminosäuremischung waren nur 14 Aminosäuren enthalten, deren Konzentrationen im Markierungsansatz von 0,44pMol/ml bis zu 5,4pMol/ml reichten. In einzelnen Versuchen wurden die fehlenden Aminosäuren (Asp, Cys, Gln, Met, Trp) zugesetzt, wobei deren Endkonzentration 20pMol/ml war.
Nach Beendigung der Markierung wurden die Minizellen in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert (90 Sekunden). Das Sediment wurde in 50µl Auftragspuffer aufgenommen, resuspendiert und für 5 Minuten gekocht. Die Aufbewahrung der markierten Proben erfolgte bei -20°C.

2.2.18. Anreicherung von Proformen

Zu diesem Zweck wurden Äthanol und Procain verwendet. Beide wurden sowohl zu Beginn der Vorinkubation als auch zu Beginn der Markierung plasmidderminierter Proteine in Minizellen eingesetzt. Die Endkonzentrationen betrugen 8% (Äthanol) bzw. 40mM bis 80mM (Procain).

2.2.19. Protein A-Sepharose-unterstützte Immunfällung (99)

Die Methode der Immunfällung mittels Antikörpern und Protein A-Sepharose wurde verwendet, um carboxyterminal verkürzte Colicin B- und M-Proteine als solche nachweisen zu können. Die dazu notwendigen Seren waren am hiesigen Institut isoliert worden (8/82).
Im Gegensatz zu 2.2.17. wurde hierbei je 1ml Minizellsuspension eingesetzt. Die markierten Minizellen wurden für 90 Sekunden in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert und das Sediment in 0,6ml Tris-Puffer (10mM Tris-HCl, pH8) aufgenommen und auf drei Reaktionsgefäße verteilt. Dann wurde wieder für 90 Sekunden abzentrifugiert. Das Sediment in einem Gefäß wurde direkt in Aftragspuffer aufgenommen. In dem einen der übrigen Gefäße wurde mit Antikörpern gegen Colicin M, im anderen mit Antiserum gegen Colicin B, gefällt. Die im folgenden beschriebenen Fällungen waren ansonsten für beide identisch.
Die Minizellen wurden in 50µl SDS-Extraktionspuffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1% SDS, pH8) resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen,wurde für 5 Minuten gekocht. Dann wurde mit 1,3ml Tris-Puffer (50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 2% Triton X-100, pH8) verdünnt und für 5 Minuten in der Eppendorfzentrifuge alle sedimentierbaren Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zweimal wurde die Zentrifugation wiederholt. Nun erfolgte die Zugabe von 15µl Protein A-Sepharose. 100mg Protein A-Sepharose (Trockengewicht) wurden zuvor in 1ml Puffer (10mM Tris-HCl, 0,05% NaN_3, pH7,5) über Nacht bei 4°C geschüttelt.
Nach dem Hinzufügen der Protein A-Sepharose wurde für 30 Minuten im Kühlraum geschüttelt und dann abzentrifugiert.

Zum Überstand wurde dieses Mal außer Protein A-Sepharose noch 12,5µl Antiserum gegeben und für 1 Stunde bei 4°C geschüttelt. Danach wurde für 3 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 1ml einer Lösung aus 0,3mM NaCl, 1% Triton X-100 und 10mM Tris-HCl, pH7,5 und einmal mit 10mM Tris-Puffer (pH7,5) gewaschen. Schließlich wurde das Sediment in 20µl Auftragspuffer aufgenommen. Die Probe konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.20. Nachweis plasmidcodierter Proteine im Maxizellsystem (74/75)

Diese Methode kam nur vereinzelt zum Einsatz, da die Hintergrundmarkierung im Vergleich zum Minizellsystem wesentlich stärker war.
Der Maxizellstamm RK5016 wurde mit den zu untersuchenden Plasmiden transformiert.Die Tochterstämme wurden zum Nachweis der plasmidcodierten Proteine wie folgt behandelt:
10ml M9-Medium wurden mit 0,1ml einer Übernacht-Kultur inokuliert. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{578} von 0,25 inkubiert. 5ml Aliquots wurden in sterilen Petrischalen im Abstand von 30cm zur UV-Lampe für 15 Sekunden unter leichtem Schwenken bestrahlt. Die so behandelten Zellen wurden in 100ml-Kolben überführt, die mit Aluminiumfolie umwickelt waren. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C wurden 0,1ml entnommen und auf einer TY-Agarplatte ausplattiert. Zum Rest wurden 20µl Cycloserin (50mg/ml) gegeben und über Nacht weiterinkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen zweimal mit M9-Salzlösung gewaschen. Dann wurden sie in 2ml Markierungsmedium resuspendiert und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

Das Markierungsmedium setzte sich zusammen aus 85ml Wasser, 10ml 10xM9-Salze, 2ml 20% Glucose, 2ml 0,1% Thiamin und 1ml 0,01% $CaCl_2$. Nach der Vorinkubation wurden zu 1ml 20µCi ^{35}S-Methionin gegeben und für eine Stunde bei 37°C markiert.
Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10mM Tris-HCl, pH8 gewaschen, das Sediment in 15µl TE-Puffer aufgenommen und 15µl Auftragspuffer hinzugefügt. Die Proben wurden für 5 Minuten gekocht und konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.21. Expression klonierter Gene im DNS-gesteuerten in vitro Translationssystem (17/100)

Verwendet wurde hierzu das "Kit" N.380 von Amersham. Diese in vitro Methode wurde angewandt, um die von klonierten Genen determinierten Proteine zu identifizieren, die im Mini- und Maxizellsystem nicht nachzuweisen waren.
Die eingesetzten Plasmide wurden über einen CsCl-Gradienten gereinigt (2.2.2.3.) und Restriktionsfragmente wurden nach 2.2.7. aus Agarose isoliert.
Ca. 2,5µg DNS wurden jeweils eingesetzt und nur die Hälfte der vorgeschriebenen Volumina der verschiedenen Lösungen. Ansonsten wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren.

2.2.22. DNS-Sequenzierung mit der Didesoxymethode (76)

Anfänglich wurden die fertigen Nukleotidlösungen und die Klenow-Polymerase von Amersham eingesetzt. Später wurden die Nukleotidlösungen selbst angesetzt und das Klenow-Fragment von Boehringer oder klonierte Klenow-Polymerase von Biolabs verwendet.

2.2.22.1. Klonierung in M13 Phagen (55)

Kloniert wurde in die M13 Phagen mp8, mp9 und mp18, mp19. Diese Phagen haben je einen "Polylinker", der in den Phagen mp8 und mp9 sowie mp18 und mp19 jeweils spiegelbildlich angeordnet ist. Wird DNS mit zwei verschiedenen Enzymen geschnitten, so kann sie in beiden Orientierungen kloniert werden. Damit können beide DNS-Stränge sequenziert werden. Der genannte "Polylinker" liegt wie bei den pUC-Vektoren im aminoterminalen Teil des α-Fragments des ß-Galaktosidasegens, welches zusammen mit Promotor und Operator in diese Phagen inseriert wurde. Von diesen Phagen infizierte Zellen wachsen langsamer als nicht infizierte und bilden daher nach dem Ausplattieren Areale, die wie trübe Plaques aussehen. Wird außerdem IPTG und X-Gal zugegeben, so sind diese Plaques blau, da durch α-Komplementation im Wirtsstamm JM101 X-Gal in einen blauen Farbstoff umgewandelt wird(siehe dazu 2.2.10.). Farblose Plaques entstehen, wenn Fremd-DNS inseriert wird und damit die α-Komplementation verhindert wird. Diese Phagen sind filamentös und besitzen einsträngige DNS. Infizieren sie ein Bakterium, so wird diese in doppelsträngige DNS umgewandelt, repliziert und kann dann wie Plasmid-DNS isoliert werden.
Der Wirtsstamm wurde stets in doppelt konzentriertem TY-Medium kultiviert. Zur Isolierung der replikativen M13-DNS wurde von einem Einzelplaque ausgegangen, der ausgestanzt und damit 1ml frische Escherichia coli-Kultur inokuliert wurde. Nach 4-5 Stunden Inkubation wurde für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand mit den Phagen bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. 100ml Medium wurden mit 1ml Phagen-haltigem Überstand und 1ml JM101-Übernachtkultur beimpft. Wieder wurde für 4-5 Stunden inkubiert.

Die Zellen wurden sedimentiert und daraus die replikative Form der Phagen-DNS nach 2.2.2.1. isoliert. Sollten größere Mengen an replikativer Form isoliert werden, so wurden die 10-fachen der angegebenen Volumina eingesetzt und die Isolierung erfolgte nach Methode 2.2.2.3..
Die Klonierung selbst mit Restriktion, Ligation und Transformation erfolgte ebenso wie mit Plasmiden als Vektoren. Verdünnungen von transformierten Zellen wurden in 3ml TY-Topagar mit ca. 10^8 Zellen des JM101-Stamms, 40µl IPTG (100mM) und 40µl X-Gal (2% in Dimethylformamid) ausplattiert.

2.2.22.2. Isolierung einsträngiger M13-DNS (Template) (85)

Um das in den Phagen klonierte DNS-Stück sequenzieren zu können, muß von den rekombinanten Phagen einsträngige DNS isoliert werden. Die M13-Phagen enthalten immer denselben Strang an Phagen-DNS und den einen oder den anderen Strang der Fremd-DNS, je nach Orientierung dieser fremden DNS. Zur Isolierung von Einzelstrang-DNS wird mittels Phenol das Hüllprotein des Phagen entfernt und die einsträngige DNS durch Äthanolfällung gereinigt. Die Methode im einzelnen: 100ml doppeltkonzentriertes TY-Medium wurde mit 1ml einer über Nacht geschüttelten Kultur von JM101 inokuliert. 2ml Aliquots wurden davon in sterile Röhrchen pipettiert. Maximal 40 Isolierungen konnten parallel durchgeführt werden. In jedem Röhrchen wurde die Kultur dann mit einem farblosen Plaque infiziert. Inkubiert wurde anschließend für 5 Stunden. Danach wurden 1,5ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten zentrifugiert. 1ml des Überstands wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Zentrifugation wurde wiederholt. Zum Überstand wurden 0,2ml

PEG-Lösung (20% PEG 6000, 2,5M NaCl) gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde für 15 Minuten auf Eis gestellt. Durch Zentrifugieren für 5 Minuten wurden die Phagen sedimentiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt. Zum Phagensediment wurde 0,1ml TE-Puffer und 50µl Phenol, gesättigt mit TE-Puffer, gegeben. Auf dem Vortex wurde für 20 Sekunden kräftig gemischt. Anschliessend wurde die Mischung bei Raumtemperatur für 15 Minuten stehengelassen. Danach wurde auf dem Vortex nochmals für 20 Sekunden gemischt und dann für 3 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben. Zu ihr wurden 10µl Natriumacetat (3M) und 250µl eiskaltes Äthanol gegeben. Die Fällung erfolgte bei -20°C für mindestens 1 Stunde. Danach wurde die DNS durch Zentrifugieren sedimentiert. Das Sediment wurde mit 1ml eiskaltem Äthanol (70%) gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer aufgenommen. Die Template-DNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.22.3. Schema für die Herstellung der Nukleotidlösungen

Die Stammlösungen der Desoxynukleotide (dNTP's) waren 20mM, die der Didesoxynukleotide (ddNTP's) waren 10mM. Zur Herstellung der Nukleotidmischungen wurden Aliquots der Stammlösungen verdünnt. Die Lösungen von dCTP, dGTP und dTTP wurden auf 0,5mM, die von ddATP auf 5mM verdünnt. Die ddCTP, ddGTP und ddTTP Stammlösungen wurden unverdünnt eingesetzt. Die Zahlen im Schema geben die eingesetzten µl an. Die Spalten mit l, m und k geben die verschiedenen Zusammensetzungen der Nukleotidmischungen für lange, mittellange und kurze Elektrophoresedauer an.

	T-Spur			C-Spur			G-Spur			A-Spur		
	l	m	k	l	m	k	l	m	k	l	m	k
dTTP	5	5	5	100	100	100	100	100	100	100	100	100
dCTP	100	100	100	5	5	5	100	100	100	100	100	100
dGTP	100	100	100	100	100	100	5	5	5	100	100	100
ddTTP	5	10	15									
ddCTP				1	2	3						
ddGTP							1,5	3	5			
ddATP										1	2	3
TE-Puffer	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
	410	415	420	406	407	408	406	408	410	401	402	403

Die Stammlösung für die "Chase"-Lösung enthielt alle vier Desoxynukleotide in einer Konzentration von jeweils 20mM. Portioniert wurden davon 1:80 Verdünnungen (250µM). Alle Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt. Die fertigen Nukleotidgemische wurden portioniert, so daß sie jeweils nur einmal aufgetaut werden mußten.

2.2.22.4. Verbinden von Primer und Template (Annealing)

Damit die Klenow-Polymerase unter Verwendung der Einstrang-DNS als Template einen neuen Strang synthetisiert, benötigt sie einen Primer. Dieser Primer ist ein Oligonukleotid, welches eine komplementäre Sequenz zu jener auf der 5'-Seite des Polylinkers hat. Zwei verschiedene Primer kamen zum Einsatz. Das verwendete 17mer stammte von Amersham, das 15mer von Biolabs. Zur "Annealing"-Reaktion wurden 5µl Template, 1µl Primer, 1,5µl Klenow-Reaktionspuffer (100mM Tris-HCl, 50mM $MgCl_2$, pH8,5) und 2,5µl bidestilliertes Wasser bei 60°C für 1-2 Stunden nach Durchmischen inkubiert. Anschließend wurde kurz abzentrifugiert.

2.2.22.5. Die Sequenzierungsreaktion

In der Sequenzierungsreaktion wird ausgehend vom Primer in 5'-3'-Richtung der neue Strang verlängert, bis ein Didesoxynukleotid eingebaut wird, welches zum Kettenabbruch führt, da ihm die 3'-OH-Gruppe fehlt. Diese Reaktion wurde in vier parallelen Ansätzen durchgeführt. In jedem Ansatz befand sich nur eines der Didesoxynukleotide. Damit wurden Kettenabbrüche nach jeweils nur einer Art von Nukleotiden erreicht. Wurde ddATP zugegeben, so war das die A-Reaktion, wurde ddCTP zugegeben war es die C-Reaktion und entsprechend für ddGTP und ddTTP.
Meist wurden die Reaktionen für 6 verschiedene Templates gleichzeitig ausgeführt:
Für 6 Templates setzte sich der "Go-Mix" aus ^{35}S-ddATP (15µl= 80µCi), Klenow-Polymerase (3µl= 15 Einheiten) und 20µl H_2O zusammen.
Übereinander an die Wand eines Eppendorfgefäßes wurden für jede Reaktion pipettiert: 2,5µl aus dem "Annealing"-Ansatz, 2µl der entsprechenden Nukleotidmischung und 1,5µl "Go-Mix". Durch Zentrifugieren wurden die Lösungen gemischt und damit die Reaktionen gestartet. Diese liefen bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Schon nach 15 Minuten wurden an die Gefäßwand 2µl "Chase"-Lösung pipettiert. Diese wurde mit der Reaktionsmischung nach 20 Minuten durch kurzes Abzentrifugieren vermischt. Nach weiteren 10 Minuten wurden 4µl der Formamidfärbelösung an die Gefäßwand gegeben und nach insgesamt 30 Minuten die Reaktion durch Mischen mit der Färbelösung gestoppt. Die Formamid-Färbelösung wurde hergestellt indem 100ml Formamid mit 5g Amberlite MD-1 für 30 Minuten geschüttelt wurden. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile abgefiltert.

Zum Formamid wurden jetzt 0,1g Xylencyanol FF, 0,1g Bromphenolblau und 4ml EDTA (0,5M) gegeben. Die Lösung wurde portioniert und bei 4°C aufbewahrt.
Die mit der Färbelösung versetzten Proben konnten bei -20°C für mehrere Wochen aufbewahrt werden, ohne zuviel an Aktivität zu verlieren.
Nachdem der größte Teil einer Sequenz einmal bekannt ist, werden nur noch wenige Klone benötigt, um die Sequenz zu vervollständigen. Um aus einer Auswahl Klone diese schnell heraus zu finden, wurde folgendermaßen vorgegangen: Eine größere Anzahl Klone, unter denen die gesuchten vermutet wurden, wurden nach 2.2.22.2 aufgearbeitet. Mit den isolierten Templates wurde nur eine Reaktion z.B. die T-Reaktion durchgeführt. Durch Vergleich mit den Autoradiographien der schon sequenzierten, konnten so die noch fehlenden Klone gefunden werden.

2.2.22.6. Gießen der Acrylamidgele (77)

Die Gießapparatur, die Thermoplatte, die "Ohrenplatte" und das Material für Kamm und Abstandshalter waren von LKB.
Zuerst wurden die Glasplatten auf den Seiten behandelt, die nachher mit dem Gel in Kontakt kamen. Die Thermoplatte wurde mit Repel-Silan, die "Ohrenplatte" mit einer Mischung aus 10ml Äthanol, 260µl 10% Essigsäure und 26µl Binde-Silan behandelt. Dadurch wurde gewährleistet, daß nach der Elektrophorese die Platten getrennt werden konnten, wobei das Gel vollständig an der "Ohrenplatte" haften blieb. Nun wurden die Abstandshalter auf der Thermoplatte angebracht und die "Ohrenplatte" in die richtige Position gelegt.
Das Acrylamidgel wurde zubereitet aus 240g Harnstoff, 38g Acrylamid, 2g Bisacrylamid und 450ml bidestilliertem Wasser. Diese Lösung wurde mit 5g Amberlite ver-

setzt und 30 Minuten gerührt. Danach wurde mittels einer Nutsche durch einen Filter abgesaugt. Zu der entjonisierten und filtrierten Lösung wurden 50ml 10-fach konzentrierter TBE-Puffer (9,3g/l EDTA, 109g/l Tris, 55g/l Borsäure, pH8,3-8,5) gegeben. Für ein Gel mit einer Dicke von 0,2mm wurden 40ml der Acrylamidlösung mit 250µl Ammoniumpersulfat (10%) und 50µl TMED versetzt. Das Gel wurde gegossen indem nach und nach die Acrylamidlösung auf die Thermoplatte gegossen und die "Ohrenplatte" darüber geschoben wurde, bis sie die Thermoplatte ganz bedeckte. Schließlich wurde der Kamm am oberen Ende zwischen die beiden Platten geschoben. Die Platten wurden zusammen geklemmt und für 30 Minuten liegengelassen. Dann wurden die Platten an die Elektrophoreseapparatur und den Thermostaten angeschlossen.

2.2.22.7 Elektrophorese (1)

Nachdem das Gel eine Temperatur von 65°C erreicht hatte, wurden die Pufferkammern mit Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer) gefüllt. War der Kamm entfernt worden, wurden die Geltaschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Vor dem Auftragen der Proben wurden sie nochmals gespült. Die für mindestens 3 Minuten auf 95°C erhitzten Proben wurden, ohne sie abkühlen zu lassen, mit einer ausgezogenen Mikropipette von LKB aufgetragen.
Die Elektrophorese wurde bei konstant 2,5kV durchgeführt. Für Kurzläufe wurde die Elektrophorese abgebrochen, nachdem die erste blaue Front das Gel verlassen hatte. Langläufe dauerten bis zu 6 Stunden. Wurde die Probe geteilt und die zweite Hälfte erst

2 Stunden nach der ersten aufgetragen, so konnten bis über 300 Basen gelesen werden.
Nach der Elektrophorese wurden die Platten getrennt und die "Ohrenplatte" mit dem Gel in 10% Essigsäure für 15 Minuten gelegt. Dadurch wurde die DNS gefällt und im Gel fixiert. Außerdem wurde dabei der Harnstoff aus dem Gel entfernt. Abschließend wurde das Gel bei 80°C für 30 Minuten getrocknet.
Nach dem Abkühlen wurde auf das Gel ein Film (Cronex 4 von DuPont) gelegt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur exponiert. Auf dem erhaltenen Autoradiogramm konnte die Sequenz gelesen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung von cmi, cma und cbi

Folgende Bezeichnungen wurden benutzt: cma für den Genort der Colicin M-Aktivität determiniert, cmi für das Colicin M-Immunitätsgen, cba für den Genlokus der für Colicin B-Aktivität codiert und cbi für das Colicin B-Immunitätsgen.
Ausgangsmaterial für die Klonierung war das konjugative Plasmid pColBM-Cl139 (79). Ein EcoRI-Fragment von diesem Plasmid kloniert in die EcoRI-Stelle von pBR322 (3) verlieh den Transformanten von Hb101 die Fähigkeit zur Synthese von Colicin M und Immunität gegen Colicin B und M. Aus den Transformanten wurde das Plasmid isoliert nach 2.2.2.1..
Die Größenbestimmung des Plasmids, das als pTO163 bezeichnet wurde, ergab 9,5kB. Dabei entfielen 5,2kB auf das Fragment aus pColBM-Cl139 und 4,3kB auf den Vektor. Die Spaltung von pTO163 mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und die elektrophoretische Größenbestimmung der erhaltenen Fragmente wurde verwendet, um eine physikalische Karte von pTO163 aufzustellen (Abb. 8).
Ein zweiter Klon mit cmi,cma und cbi wurde erhalten nach Doppelverdau mit EcoRI und ClaI von pTO163 und pBR322. Das so konstruierte Plasmid pCE2 enthielt ein 2,9kB großes DNS-Stück, welches dem ClaI-Fragment aus der inserierten DNS von pTO163 in seiner Größe entsprach (Abb. 8). Dieselben Gene konnten auf einem 3,7kB großen PstI-EcoRI-Stück in pBR322 kloniert werden nach einem Doppelverdau von pTO163 und pBR322 mit diesen Enzymen. Dies war Plasmid pPE6 (Abb. 8).

Das in pTO163 klonierte Fragment wurde durch einen Partialverdau mit Sau3A auf 1,5kB verkleinert und in die BamHI-Stelle von pBR322 ligiert. Das Plasmid pTO4 (Abb. 8) wurde gefunden durch die Größenbestimmung von 64 Plasmiden. Sechs Plasmide lagen mit ihrer Grösse zwischen jener von pBR322 und der von pTO163. Dasjenige mit dem kleinsten inserierten Fragment wurde weiter verwendet. Die Plasmide waren isoliert worden aus Transformanten, die Colicin M produzierten und immun gegen Colicin M nicht aber gegen Colicin B waren. Durch Erstellen von Restriktionskarten der genanten Plasmide und Vergleich dieser untereinander, konnte gezeigt werden, daß alle drei Genorte dicht beieinander liegen. Sie befinden sich alle auf dem 2,1kB umfassenden Bereich, der dem PstI-ClaI-Stück aus dem in pTO163 klonierten Fragment entspricht. Gleichzeitig konnte die Lage von cbi mit rechts von cmi und cma bestimmt werden, da cbi auf pPE6 nicht aber auf pTO4 vokommt.

Die Gene für die Aktivität und Immunität der Colicine B und M ausgehend von Plasmid pF166 wurden von Schramm kloniert (66). Der verwendete Vektor war pACYC184 (Abb. 2). In die BamHI-Stelle dieses Vektors wurde ein 6kB großes Fragment von pF166 nach dessen Partialverdau durch Sau3A ligiert (Abb. 9). Ein Vergleich der Restriktionskarten zwischen den rekombinanten Plasmiden pES2 und pTO163 ergab vollständige Übereinstimmung der klonierten Colicinregionen. Mit EcoRI liesen sich daher die Gene cmi, cma und cbi aus pES2 subklonieren. Die Ausgangsplasmide pColBM-Cl139 und pF166 unterscheiden sich ansonsten in ihrem Restriktionsmuster (66). Der Vergleich dieser Plasmide ließ zudem den Schluß zu, daß cba rechts von cbi liegt, denn die Insertion in pES2 ist rechts grösser wie jene in pTO163, links aber kleiner (vergleiche Abbildung 8 und 9).

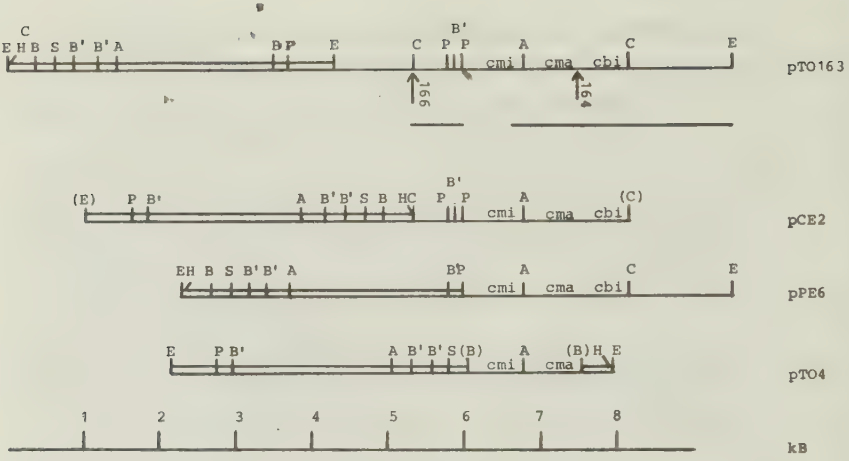

Abb. 8: Restriktionskarten von rekombinanten Plasmiden aus einem Fragment von pColBM-C1139 (einfache Linie) und pBR322 (doppelte Linie). Die ungefähre Lage von cmi, cma und cbi ist eingetragen. Die Pfeile bei 164 und 166 geben Tn5-Insertionen an, wobei die letztere zu zwei Deletionen führte, die als waagrechte Linien eingezeichnet sind. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind wie folgt bezeichnet: A=AvaI, B= BamHI, B'=BglI, C=ClaI, E=EcoRI, H=HindIII, P=PstI, S=Sau3A. Schnittstellen, die nach der Ligation nicht mehr zugänglich waren, sind in Klammern gesetzt.

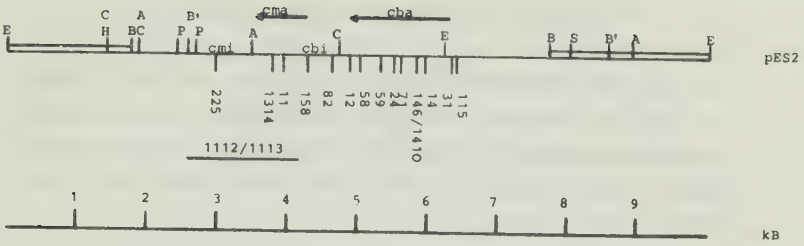

Abb. 9: Physikalische Karte mit Restriktionsstellen des rekombinanten Plasmids pES2. Die einfache Linie bezeichnet das Fragment aus pF166, die Doppellinie den Vektoranteil (pACYC184). Die Zahlen darunter bezeichnen Tn5-Insertionen: 225 reduzierte die Immunität gegen Colicin M; 11, 158 und 1314 führten zum Ausfall der Colicin M-Aktivität; 12, 14, 24, 31, 58, 59, 71, 115, 146 und1410 führten zum Verlust der Colicin B-Aktivität. Die Linie darunter gibt die durch zwei unabhängige Tn5-Insertionen erhaltene, anscheinend identischen Deletionen an. Die Pfeile darüber geben die Lage, die ungefähre Größe und die Transcriptionsrichtung der Gene cma und cba an. Die Bezeichnung der Schnittstellen für Restriktionsenzyme ist dieselbe wie bei Abbildung 8.

3.2.1. Tn5-Insertionsmutanten von pTO163

Mit Tn5-Mutanten der Plasmide pTO163 und pES2 wurde der Minizellstamm DS410 transformiert. So konnte die jeweils interessierende Mutante direkt im Minizellsystem auf plasmidcodierte Proteine untersucht werden.
Von pTO163 wurden zwei Tn5-Mutanten isoliert. Die Tn5-Insertion 164 (Abb. 8) führte zum Ausfall von cma. Dagegen waren cmi und cbi nicht betroffen. Die Insertion 166 lag zwar in keinem Colicinort, jedoch verursachte sie zwei Deletionen. Die eine davon erstreckte sich über cma und cbi (Abb. 8). Transformanten mit diesem mutierten Plasmid waren gegen Colicin M immun, sensitiv gegen Colicin B und produzierten kein Colicin M. Die beiden Deletionen umfassten insgesamt 3,5kB. Restriktionsanalysen zusammen mit den Phänotypen dieser Mutanten ergaben die Sequenz cmi cma. Somit war für die gesamte Region die Reihenfolge der Gene festgelegt: cmi cma cbi cba. Diese Reihenfolge wurde noch bestätigt durch Restriktionsanalysen der Tn5-Mutanten von pES2 und durch den Nachweis pES2 und pES2::Tn5 kodierter Proteine.

3.2.2. Tn5-Mutanten von pES2 (66)

Ungefähr ein Drittel der Tn5-Insertionen inaktivierte entweder die Colicin M- oder die Colicin B-Synthese. Von 200 getesteten Kolonien hatte keine beide Colicin-Aktivitäten eingebüßt. Lag die Insertion innerhalb von cba, so war stets die Colicin M-Aktivität reduziert. Dies gilt auch für Tn5-Insertionen in cba auf pColBM-Cl139. Im umgekehrten Fall, Tn5 in cma inseriert, konnte keine Auswirkung auf die Colicin B-Aktivität festgestellt werden.

Es konnten keine Mutanten gefunden werden, die voll sensitiv gegen Colicin B oder M waren. Einige zeigten jedoch eine reduzierte Immunität. Die Insertion 225 (Abb. 9) zum Beispiel führte dazu, daß Zellen mit diesem mutierten Plasmid nur sensitiv waren gegen eine 100-fache Verdünnung von Colicin M, während auf vollsensitiven Stämmen ein klarer Lysehof erhalten wurde durch Auftropfen von 10µl einer 10^{-6}-fachen Verdünnung.

3.3. Nachweis der Produkte und der Transcriptionsrichtung von cma und cba

Eine Auswahl von erhaltenen Mutanten, bei denen die Tn5-Insertionsstelle durch Restriktionsanalysen kartiert wurde, enthält Abbildung 9. Diese sind in Tabelle 2 aufgeführt.
Die von den Plasmiden kodierten Proteine wurden nachgewiesen durch Markierung im Minizellsystem mit einer ^{14}C-Aminosäuremischung, anschließender Elektrophorese und Fluorographie. Die Größe der Polypeptide wurde bestimmt durch Vergleich mit markierten Schwanzproteinen von T5, die etwas kontaminiert waren mit dem Hauptkopfprotein (46 k)(Abb. 11). pES2 exprimierte drei Proteine (nicht gezeigt), die Chloramphenicol-Transacetylase (21 k) des Vektors pACYC184 und zwei Polypeptide mit den jeweiligen Molekulargewichten 27 k und 58 k, welche jenen von Colicin M und B entsprachen. Antikörper gegen Colicin B präzipitierten nur das 58 k Protein (Abb. 11). Minizellen mit den Insertionen in cba an den Stellen 58, 59, 24, 146 und 1410 (Abb. 9) ergaben Präzipitationen von Polypeptiden mit Größen, die übereinstimmten mit den erwarteten, wenn cba von rechts nach links transcribiert wurde. Die aus einer Eichkurve entnommenen

Molekulargewicht der verkürzten Proteine sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Polypeptide von weiteren Tn5-Insertionsplasmiden stimmten alle mit den Positionen der Insertionen überein, die durch Restriktionsanalysen ermittelt wurden (Abb. 9 und Tabelle 2). Die Schlußfolgerung war, daß cba für Colicin B codiert und die Transcriptionsrichtung wie in Abb. 2 angegeben auf cbi zu verläuft. Dieselbe Analyse wurde für Colicin M durchgeführt. Die Proteine, die von den Plasmiden exprimiert wurden sind unter a zu sehen und die Präzipitate, die mit Antikörpern gegen Colicin M erhalten wurden, unter c (Abb. 10). pCE2 exprimiert nur ein weiteres Hauptprotein, welches unter der ß-Lactamase und ihrem Vorläufer zu sehen ist. Die letztgenannten Proteine werden von pBR322 codiert. Das Hauptprotein war das einzige, das mit Antiserum gegen Colicin M präzipitiert wurde. Es wurde kein Protein gefällt, wenn die Minizellen nur pBR322 enthielten. Verkürzte Polypeptide von Colicin M wurden erhalten, wenn die Minizellen Plasmide mit Tn5-Insertionen an den folgenden Positionen enthielten: 1314, 11 und 164 (Im letztgenannten Fall kann es auf der Reproduktion 10 kaum gesehen werden.). Es konnte kein Polypeptid gefunden werden in Minizellen mit dem Insertionsplasmid 158. Entweder ist es zu klein, um im verwendeten Elektrophoresesystem nachgewiesen zu werden, und/oder es wird von den Antikörpern nicht gefällt. Dasselbe Ergebnis wurde mit dem Deletionsplasmid 1112 erhalten. Die Tn5-Insertionsplasmide 1314, 11 und 158 exprimieren noch Colicin B und Chloramphenicol-Transacetylase vom Vektor pACYC184. Die Molekulargewichte der verkürzten Colicin M-Proteine sind in Tabelle 2 aufgeführt. Aus der Größe der verkürzten Proteine und der Lage der Tn5-Insertionen ergibt sich dieselbe Transcriptionsrich-

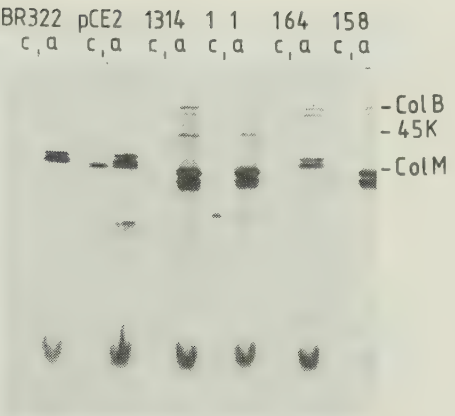

Abb. 10: Fluorographie von Proteinen, markiert mit einer ^{14}C-Aminosäurenmischung in Minizellen, die mit den darüber angegebenen Plasmiden transformiert wurden. In den mit a bezeichneten Spuren wurde der gesamte Zellinhalt aufgetrennt, in jenen unter c nur das mit Antiserum gegen Colicin M gefällte Material. pCE2, 164 und pBR322 exprimieren die ß-Laktamase (28 k) und ihre Proform (31 k). 1314, 11 und 148 exprimieren die Chloramphenicol-Acetyltransferase (21 k) von pACYC184. Die Tn5-Insertionsplasmide exprimieren zudem die Neomycin-Phosphotransferase II (25 k) und 4 weitere Proteine (58, 54,53, 49 k) mit Ausnahme von 164, bei dem das Neomycin-Phosphotransferase-kodierende Gen durch schneiden mit XhoI entfernt wurde.

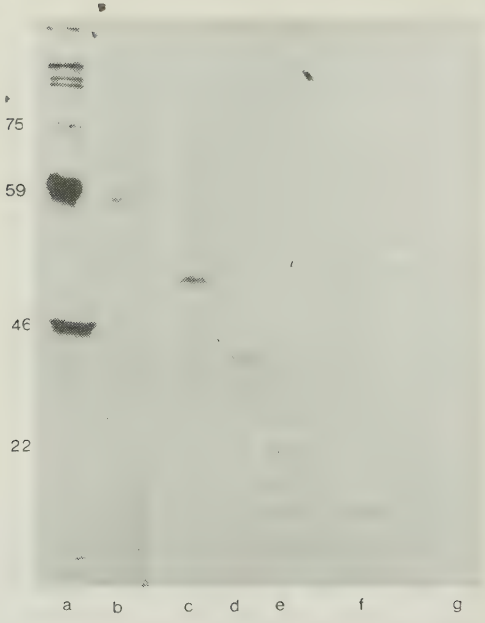

Abb. 11: Fluorographie von ^{14}C-markierten Proteinen, aufgetrennt auf einem Acrylamidgel mit 15% Acrylamid und 0,7% Bisacrylamid. a, T5-Phagenproteine die als Molekulargewicht-Standards eingesetzt wurden. Die Proteine wurden in Minizellen exprimiert, die mit Tn5-Insertionsmutanten von pES2 transformiert wurden: b, 1314; c, 58; d, 59; e, 24; f, 146; g, 1410 von Abbildung 9. Colicin B (b) und seine verkürzten Derivate (c bis g) wurden mit Antiserum gegen Colicin B gefällt.

Tabelle 2: Eigenschaften der Tn5-Insertionsmutanten der rekombinanten Plasmide pES2 und pTO163

Position der Insertion	betroffenes Gen	Colicin B[a]	Colicin M[a]
12	cba	54	27
58	cba	37	nb
59	cba	29	nb
24	cba	21	nb
71	cba	20	27
146	cba	18	nb
1410	cba	15	nb
14	cba	13	nb
31	cba	keines	27
115	cba	keines	nb
225	cmi	58	27
1112	cma cmi	58	keines
1314	cma	58	20
11	cma	nb	15
164	cma	nb	10
158	cma	nb	keines
82	keines	58	27

[a]Die Proteine wurden gefällt mit Colicin-spezifischen Antikörpern.
Die Größe der Proteine ist in Kilodalton angegeben. nb, nicht bestimmt. Die Insertionsstellen sind die in Abb. 8 und 9 eingezeichneten.

tung für Colicin M wie für Colicin B, nämlich von rechts nach links (Abb. 9).

3.4. Versuche zum Nachweis einer Proform von Colicin M

Um eine Proform von Colicin M nachzuweisen wurden die Plasmide pTO163, pTO4 und als Kontrolle pBR322 verwendet. Der Nachweis plasmidcodierter Proteine wurde im Minizellsystem (2.2.17.) geführt. Zur Anreicherung von Proformen wurde Äthanol oder Procain eingesetzt. Der Vorläufer der ß-Lactamase wurde sowohl durch Äthanol als auch Procain angereichert (nicht gezeigt). In keinem Fall konnte jedoch eine Proform von Colicin M gefunden werden.

3.5. "French-Press"-Aufschluß von Colicin M-Produzenten und Test der erhaltenen Fraktionen auf Colicin M-Aktivität

Für diese Experimente wurden Stämme (Hb101) mit den Plasmiden pTO163, pTO4 und der Stamm C1139 verwendet. Sie wurden jeweils in TY-Medium bis zu einer OD_{578} von 2 angezogen, abzentrifugiert und das Zellsediment in PBS mit 0,1% Triton X-100 resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit der"French-Press". Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert(6000g für 10 Minuten) und schließlich das Lösliche vom Sedimentierbaren in der Ultrazentrifuge bei 100000g in 20 Minuten getrennt.
Auf diese Weise wurden 3 Fraktionen erhalten: Kulturüberstand, Membranfraktion (=Sediment nach Ultrazentrifugation) und Cytoplasmabestandteile mit Anteilen aus dem Periplasma (=Überstand nach Ultrazentrifugation). Nach Einstellen derselben Volumina wurden Verdünnungsreihen in PBS das 0,1% Triton enthielt an-

gefertigt und die Colicin M-Aktivität bestimmt. Der pTO4-haltige Stamm schied ins Medium ca. das 10^3-fache an Colicin M aus im Vergleich zu C1139, während im Kulturüberstand von Hb101 mit pTO163 kein Colicin M nachweisbar war. In der Membranfraktion aller 3 Stämme wurden ungefähr dieselben Colicin M-Aktivitäten gefunden. Verdünnungen zwischen 10^{-2} und 10^{-3} erzeugten noch klare Lysehöfe. Die Cytoplasmafraktion von C1139 und dem pTO163-haltigen Stamm konnte bis zu 10^{-2} verdünnt werden, um klare Lysehöfe zu erzeugen. Im Cytoplasma von Hb101 mit pTO4 wurde eine um den Faktor 1000 höhere Colicin M-Aktivität gefunden. Wie schon die Größe der Hemmhöfe um Colicin M-produzierende Klone zeigte, exprimiert pTO4 am meisten Colicin M. Dieselben Versuche wurden mit pTO163 und pTO4 nach Induktion mit Mitomycin C (0,2µg/ml) durchgeführt. In keiner der genannten Fraktionen konnte eine Steigerung der Colicin M-Aktitvität gefunden werden, die um mehr als das 10-fache erhöht war. Dies steht im Gegensatz zu früheren Experimenten mit C1139, dessen Colicinproduktion mit Mitomycin C um einige Zehnerpotenzen gesteigert werden konnte (81). Keiner der untersuchten Stämme wurde in seinem Wachstum durch Mitomycin C (0,2µg/ml) beeinträchtigt, wie Versuche im Biophotometer zeigten.

3.6. Subklonierung von *cmi*

Die Analyse der Restriktionskarte von pTO163 war Anstoß zu der Überlegung, ob nicht die AvaI-Schnittstelle zwischen den Genen *cmi* und *cma* liegen könnte (Abb.8). Dies sollte dann eine Subklonierung von *cmi* ermöglichen. Um dies zu verifizieren, wurde das in pTO163 klonierte EcoRI-Fragment isoliert, mit PstI und AvaI gespalten und in den SalI/PstI geschnittenen Vektor pUC8 (93) ligiert.

Die Isolierung war notwendig, da sowohl pTO163 als auch pUC8 Resistenz gegen Ampicillin vermitteln. Transformiert wurde JM101. Unter 272 getesteten weissen Kolonien auf TY-Platten mit IPTG und X-Gal waren 12 immun gegen Colicin M und T5 sensitiv. Keine dieser Kolonien produzierte Colicin M und alle waren sensitiv gegen Colicin B. Das Plasmid pTO195 aus Kolonie Nr.195 wurde isoliert (2.2.2.1.). Nach HindIII-BamHI-Doppelverdau ergab sich die Größe der Insertion mit 0,8kB. Dies entspricht der Größe des PstI-AvaI-Fragments aus pTO163 (Abb. 8). Mit PstI, nicht aber mit SalI oder AvaI, konnte pTO195 linearisiert werden. Dies mußte auch gefordert werden, nach Ligation eines AvaI-Endes mit einem SalI-Ende. Damit war nochmals die Lage von cmi als links von cma ermittelt worden.

3.7. Tn1000-Mutagenese von pTO195

Tn1000 (Abb. 4) ist ein Transposon, das auf dem F-Faktor vorkommt. Zur Mutagenese ist es geeignet, da es Kointegrate zwischen dem F-Faktor und gleichzeitig in der Zelle vorliegenden Multicopyplasmiden initiieren kann. Durch Konjugation können diese Kointegrate auf eine Rezipientenzelle übertragen werden. Dort zerfallen sie wieder in die Ausgangsplasmide. Das Multicopyplasmid behält aber eine Kopie des Tn1000. Durch Selektion auf die Antibiotikaresistenz des Rezipienten und der vom Multicopyplasmid vermittelten erhält man Zellen, die ein durch Tn1000 mutagenisiertes Plasmid tragen.
Die unter 2.2.14. beschriebene Methode wurde benutzt. Als Donorstamm wurde CR63 verwendet. Er wurde transformiert zum einen mit pTO195 zum anderen mit pUC8.

Die erhaltenen Ampicillin-resistenten oder Ampicillin-resistenten und zugleich gegen Colicin M immunen Transformanten wurden mit dem Stamm H1443 gekreuzt. Jene Exkonjuganten die pUC8::Tn1000 enthielten waren sowohl sensitiv gegen Colicin M wie auch gegenüber T5. Von 58 getesteten Tn1000-Mutanten von pTO195 waren 5 Colicin M und T5 sensitiv, die restlichen waren Colicin M-immun. Eine genaue Kartierung der Position von Tn1000 wurde versucht, erbrachte aber keine befriedigenden Ergebnisse wegen dem Mißverhältnis der Größe von pTO195 (3,5kB) zu der Größe des Transposons (5,7kB) d.h. die erhaltenen Unterschiede in den Molekulargewichten der Restriktionsfragmente von Tn1000 ohne und mit Anteilen aus pTO195 waren zu gering. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, hätte eine Kartierung erfolgen müssen mit Restriktionsenzymen, die Vierersequenzen erkennen. Eine Restriktionskarte von Tn1000 mit Schnittstellen von einer Auswahl solcher Enzyme stand aber nicht zur Verfügung. Der deshalb notwendige Aufwand schien den zu erwartenden Erkenntnisgewinn nicht zu rechtfertigen.
Mit den Colicin M-Immunität determinierenden Tn1000-Insertionsplasmiden pTO344 und pTO34195 sowie den Insertionsmutanten pTO345 und pTO3412, die keine Immunität mehr vermittelten und dem Tn1000-Derivat von pUC8 pTO8 wurde weitergearbeitet (siehe 3.10. und Tabelle 5).

3.8. Versuche zur Subklonierung von cma

col^+imm^--Klone wurden von Colicin E1 beschrieben (38). Sie bildeten auf Agarplatten Kolonien von abnormem Phänotyp. Für Colicin E3 gelang die Subklonierung des Aktivitätsgens in Zellen, die ein kompatibles Plasmid trugen, das die Immunität gegen Colicin E3 determinierte (60).

Die Subklonierung von cma wurde versucht, um dem Mechanismus der Immunität auf die Spur zu kommen und um zu erkennen, ob Colicin M zur Entfaltung seiner Aktivität von außen in die Zelle gelangen muß.
Nach Doppelverdau von pTO4 mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und AvaI (Abb. 8) und von pACYC184 (Abb. 2) mit HindIII und SalI wurde ligiert und drei verschiedene Stämme damit transformiert. Diese Stämme waren TO195, P8 und BR158. TO195 trägt das cmi-Gen auf dem Multicopyplasmid pUC8, P8 ist eine fhuA-, BR158 ist eine tonB-Mutante. Beide letztgenannten Gene sind für die Translokation von Colicin M an seinen Wirkort essentiell. Das HindIII-AvaI-Fragment aus pTO4, das cma trägt, wurde isoliert, in den HindIII-SalI-geschnittenen Vektor pACYC184 ligiert und damit alle drei genannten Stämme transformiert. Colicin M-Produzenten wurden nur unter den Transformanten gefunden, die nach der zuerst beschriebenen Klonierungsstrategie erhalten wurden. Diese enthielten jedoch das komplette Ausgangsplasmid pTO4. Beide Klonierungsstrategien wurden zweimal angewandt. Mehrere hundert Transformanten wurden getestet.

3.9. Untersuchung der Fraktionen von cmi$^+$-Kulturen auf ihre Schutzwirkung gegen Colicin M

Um dies zu klären wurde der Stamm DS410, transformiert mit pTO166 (Abb. 8), verwendet. Dieses Plasmid vermittelt Immunität gegen Colicin M, nicht jedoch gegen Colicin B und keine Colicin M-Aktivität. Als Vergleichs- und Kontrollstämme wurden derselbe Stamm mit dem Plasmid pTO164 (Abb. 8) und Hb101 eingesetzt. Zum Einsatz kamen Übernachtkulturen.
Die Fraktionierung wurde wie unter 3.5. beschrieben vorgenommen. Die Schutzwirkung des Kulturüberstands

der löslichen Fraktion und der ultrazentrifugierbaren Fraktion wurde auf zweierlei Weise bestimmt. Zum einen wurde jeweils zuerst sechsmal 10µl der betreffenden Fraktion auf Topagar mit dem Indikatorstamm aufgetropft und nach vier Stunden auf dieselben zuvor markierten Stellen je 10µl aus einer Colicin M-Verdünnungsreihe. Die Verdünnungen reichten von 10^{-1} bis 10^{-6}.Colicin M erzeugt nur bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} klare Lysehöfe.
Zum andern wurden von Colicin M und von jeder Fraktion alleine 10µl aufgetropft. Die verschiedenen Fraktionen erzeugten im Gegensatz zu Colicin M keine Lysehöfe.
Im zweiten Test wurden 10µl jeder Fraktion mit je 10µl aus der Colicin M-Verdünnungsreihe für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden jeweils 10µl aus diesen Mischungen auf Indikatorbakterien aufgetropft. Dasselbe wurde mit Colicin B und den Fraktionen des pTO164-tragenden Stamms (*cmi*$^+$*cbi*$^+$) gemacht.
In keinem Falle konnte eine Schutzwirkung beobachtet werden. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß Zellen mit pColBM-C1139, pTO163, pTO164, pTO166, pTO4 und pTO195 auch gegen die höchsten zur Verfügung stehenden Konzentrationen von Colicin M immun sind. Für pTO163 und pColBM-C1139 gilt dies auch bezüglich Colicin B.

3.10. Versuche zur Identifizierung des *cmi*-Genprodukts

Für *in vivo*-Versuche wurde das Maxi- und das Minizellsystem eingesetzt. Verwendung dazu fanden die Plasmide pTO163, pTO166, pTO4 und pTO195 mit denen sowohl der Minizellstamm DS410 als auch der für das Maxizellsystem geeignete Stamm RK5016 transformiert wurden.

Die erhaltenen Transformanten waren vollimmun gegen Colicin M. Daneben wurden auch Tn1000-Insertionsmutanten von pTO195 eingesetzt, die zum Teil zum völligen Ausfall der Immunität führten. Mittels radioaktiver Markierung der Plasmid-codierten Proteine in den genannten Systemen sollte das Immunitätsprotein nachgewiesen werden. Da pUC8 ein mit IPTG induzierbarer Expressionsvektor ist wurden die Markierungen mit pUC8-Derivaten unter IPTG-Induktion durchgeführt. Die Transcriptionsrichtung von cmi war noch nicht bekannt und deshalb wurde cmi auch in pUC9 kloniert. Das erhaltene Plasmid war pTO591. Damit lag das Immunitätsgen in beiden möglichen Orientierungen zum induzierbaren ß-Galactosidase-Promotor vor. Daß cmi jeweils in nur einer Orientierung vorlag, war gewährleistet durch die Klonierung nach Doppelverdau auch des Vektors mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen. Außerdem wurden bei Markierungsversuchen mit pTO166, pTO195 und pTO591 verschiedene Colicin M- Konzentrationen im Markierungsansatz eingestellt. Dabei wurde an die Möglichkeit gedacht, daß das Immunitätsgen durch "sein" Colicin induziert werden könnte. Ebenso wurde versucht, mit Mitomycin C die Transcription von cmi zu induzieren.

Die Markierung erfolgte nicht nur mit einer ^{14}C-Aminosäuremischung, sondern auch zusätzlich mit ^{35}S-Methionin. Darüberhinaus wurden auch Markierungsversuche vorgenommen, bei denen noch die nicht in der ^{14}C-Aminosäuremischung enthaltenen Aminosäuren in der geeigneten Konzentration (20pMol/ml) zugegeben wurden (siehe auch 2.2.17.).

Da mit einem kleinen Protein als Genprodukt von cmi gerechnet werden mußte (Abb. 8, pTO163 mit der Tn5-Insertion 166 und den dazugehörenden Deletionen; die Größe der Insertion von pTO195 ist 0,8kB), wurden

verschiedene Gelsysteme, speziell entwickelt für den Nachweis solcher Proteine, eingesetzt (2.2.15.2. und 2.2.15.3.). Auch verschiedene Fixier- und Färbemethoden für Polyacrylamidgele wurden angewandt (69). Zudem wurden die Proben auch ungekocht aufgetragen. Trotz all dieser Bemühungen konnte das Immunitätsprotein nicht identifiziert werden.
So blieb als letzte Methode nur noch das DNS-gesteuerte in vitro Translationssystem. Zum Einsatz kam ein käufliches System (2.2.21.). Die verwendeten Plasmide waren über CsCl-Gradienten gereinigt worden (2.2.2.3.). Die eingesetzten Restriktionsfragmente wurden mittels der Gefrier-Phenol-Methode (2.2.7.) aus Gelen mit "niedrigschmelzender" Agarose isoliert. Verwendet wurden dieselben Plasmide wie in den in vivo-Systemen. Die Tn1000-Derivate von pTO195 waren die Colicin M-Immunität-vermittelnden Plasmide pTO344 und pTO34195. Die Tn1000-Insertionen von pTO345 und pTO3412 führten zum völligen Ausfall des Immunitätsgens. Daneben wurde auch das isolierte 0,8kB große HindIII-BamHI-Restriktionsfragment aus pTO195 auf seine Expressionskapazität hin untersucht. Die Markierung der von den eingesetzten Plasmiden bzw. dem Restriktionsfragment determinierten Proteine erfolgte mit ^{35}S-Methionin. Die elektrophoretische Auftrennung wurde auf Polyacrylamidgelen mit 15% Acrylamid (Methode 2.2.15.1.) oder auf Gelen, die 6M Harnstoff enthielten (Methode 2.2.15.3.), vorgenommen. Als Größenstandards wurden ^{14}C-markierte Proteine von Amersham verwendet. Die ^{14}C-markierten Proteine waren: Insulin (5,7k), Aprotinin (6,5k), Cytochrom C (12,5k), Trypsininhibitor (20k) und Carboanhydrase (29k). Da auf Fluorographien in der Spur mit diesen Standards mehr Banden auftraten als Proteine eingesetzt wurden,

war eine eindeutige Molekulargewichtsbestimmung alleine damit nicht möglich. Daher wurden auch "kalte" Standardproteine eingesetzt: Cytochrom C (12,5k), Lysozym (14,3k), Myoglobin (17,2k), ß-Lactoglobulin (18,4k), Trypsininhibitor (20k), Chymotrypsinogen (25k) und Colicin M (27k).
Das cmi-tragende HindIII-BamHI-Fragment exprimierte 6 Proteine (Abb. 12,e). Die Molekulargewichtsbestimmung war schwierig, da die Eichkurve im Bereich zwischen 18k und 20k abknickte. Die ermittelten Größen der Proteine waren 19k, 18k, 14,5k, 12,5k, 9k und 8k. Die angegebenen Molekulargewichte verstehen sich mit einer Toleranz von ± 0,5k. Die vierte und fünfte Proteinbande waren nicht immer elektrophoretisch zu trennen (vgl. Abb. 12,e und Abb. 20,a und b). Das am stärksten markierte Protein hatte ein Molekulargewicht von 14,5k (Abb. 12,e). Diese Proteine wurden auch gefunden, wenn die von pTO195 exprimierten Proteine markiert wurden (Abb. 12,d). Zur Unterscheidung der vom Vektoranteil und der von der klonierten DNS determinierten Proteine wurden auch die von pUC8 exprimierten Proteine markiert und aufgetrennt (Abb. 19,i). Im Fall von pTO4 (Abb. 19,s) und pTO163 (Abb. 12,c) waren nur noch die vier größten Proteine (19k, 18k, 14,5k und 12,5k) nachzuweisen. Wurde pTO344 daraufhin untersucht, so wurden dieselben Proteine gefunden wie mit pTO195 (Abb. 13,g und h). Mit dem ebenfalls Immunität gegen Colicin M vermittelnden Plasmid pTO34195 konnte keine ausreichende Markierung erreicht werden (Abb. 13,i). Die Tn1000-Insertion in pTO345, welche zum Ausfall von cmi führte, eliminierte auch die Proteine mit 19k, 18k, 14,5k und 12,5k (Abb. 13, k und l). Da aber die Banden, welche die Proteine mit 9k und 8k repräsentierten, erhalten blieben, schieden sie als die Proteine aus, die Immunität gegen Colicin M vermitteln.

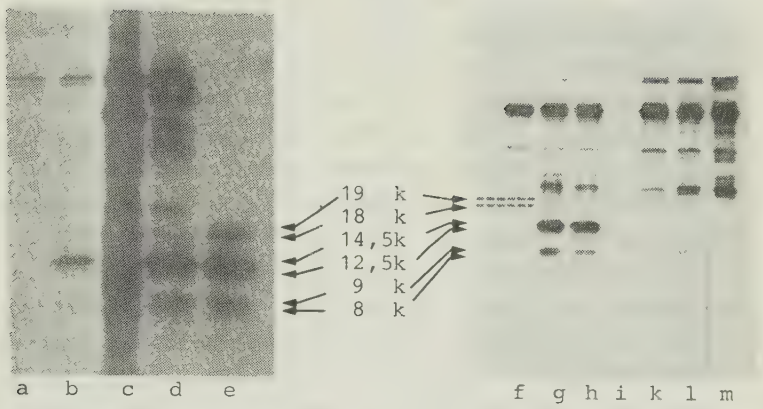

Abb. 12 und 13: Fluorographien von Proteinen, die mit ^{35}S-Methionin im DNS-gesteuerten in vitro Translationssystem markiert wurden. Eingesetzt in dem System wurde pTO195 (d) und die daraus isolierte Insertion (e) sowie die verschiedenen Tn1000-Insertionsmutanten von pTO195: a, k und l pTO345 (cmi$^-$); b, g und h pTO344 (cmi$^+$); i pTO34195 (cmi$^+$); m pTO3412 (cmi$^-$). In Spur h und l wurden die Proteine aufgetragen nach Markierung in Gegenwart eines Protease-Inhibitors. Daneben wurde auch pTO163 (c) eingesetzt und als Standard-DNS aus dem "Kit" pAT153 (f). Aufgetrennt wurden die Proteine auf Harnstoffpolyacrylamidgelen (19% Acrylamid; 0,074% Bisacrylamid; 6M Harnstoff).

Nicht klar zu entscheiden war, ob die 12,5k und 14,5k Proteine von pTO345 und pTO3412 (ebenfalls cmi⁻) noch in kleinen Mengen exprimiert wurden (Abb. 13,k,l und m), da in der Spur mit nur vom Vektor codierten Proteinen auf der Höhe von 12,5k ebenfalls eine Bande erscheint und da in den mit pTO345 und pTO3412 bezeichneten Spuren noch eine schwache Bande auftritt, die ein Protein mit 14,5k repräsentiert. Die letztgenannte Bande ist auf Abbildung 13,k,l,m zu erkennen. Eine eindeutige Identifizierung eines Proteins als das Immunitätsprotein war nicht möglich. Als "Kandidaten" blieben die 19k, 18k, 14,5k und 12,5k großen Proteine. Auch der Einsatz von Proteaseinhibitoren machte keine eindeutige Zuordnung möglich. Der Einfluß von ß-Mercaptoäthanol im Auftragspuffer wurde ebenfalls untersucht. Es hatte keine Auswirkungen auf die elektrophoretische Auftrennung der interessierenden Proteine.

3.11. Sequenzierung von cmi

Die Sequenzierung von cmi wurde vorgenommen, um über die erhaltenen Sequenz das Molekulargewicht des Immunitätsproteins zu ermitteln, gezielte Subklonierungen und Mutagenesen durchführen zu können und eventuell schon strukturelle Aussagen abzuleiten. Sequenziert wurde nach der Sanger-Didesoxymethode (2.2.22.). Dazu wurde das ganze HindIII-BamHI-Fragment mit 0,8kB aus pTO195 sowie HindIII-Sau3A-, TaqI- und TaqI-BamHI-Stücke davon in die M13-Phagen kloniert.(Abb. 14). Im Biophotometer konnte gezeigt werden, daß nach Colicin M Zugabe zu Kulturen von JM101 mit M13-Phagen nur dann keine Lyse eintrat, wenn diese Phagen das komplette HindIII-BamHI-Fragment trugen. Dies belegte, daß das cmi-Gen mit dem Promotor in die M13-Phagen kloniert wurde.

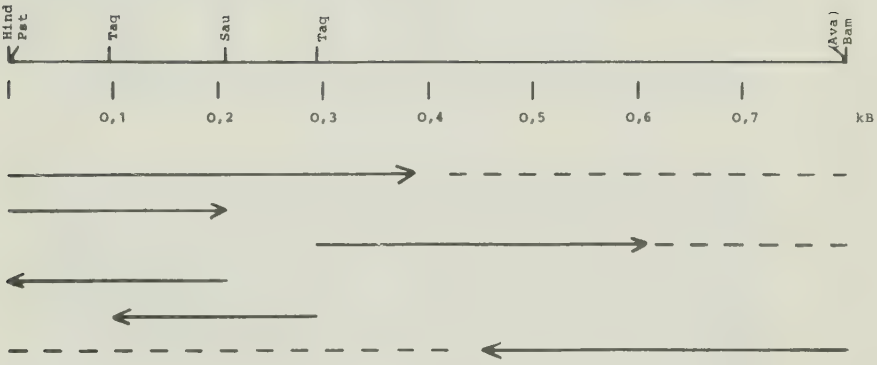

Abb. 14: Restriktionskarte des 0,8 kB großen sequenzierten DNS-Fragments. Eingezeichnet sind die Restriktionsstellen, die zur Subklonierung in die M13 Phagen genutzt wurden. Die Pfeile geben die Länge und Richtung der Sequenzierung an. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die nicht sequenzierten Teile der Klone. Schnittstellen in Klammern sind nach der Ligation nicht mehr zugänglich gewesen.

Für die Klonierung wurden zum Teil die Restriktionsfragmente in "niedrigschmelzender" Agarose mit dem Vektor ligiert (2.2.8.).
Zwei Bereiche von jeweils ca. 40 Basenpaaren wurden nur in einer Richtung sequenziert, wie aus Abbildung 14 hervorgeht. Dies schien vertretbar zu sein, da diese kurzen Sequenzen besonders gut zu lesen waren. Die Nukleotidsequenz ist in Abbildung 15 dargestellt.

3.12. Analyse der Nukleotidsequenz

Die Auswertung der gefundenen Sequenz ergab auf dem einen Strang in HindIII-BamHI-Richtung (dies entspricht hier der 5'-3'-Richtung) ein 423 Basen umfassendes offenes Leseraster mit Shine-Dalgarno-Sequenz, "-10" und "-35" Region (Abb. 15 und Tabelle 3). Zur Identifizierung der Ribosomenbindestelle (86) wurden auch die 4 Regeln für die Primärstruktur einer RBS herangezogen (95): 1) Die Shine-Dalgarno-Sequenz liegt 6-9 Nukleotide vor dem Startcodon 2) In Position -1 befindet sich kein G 3) In Position -1 bis -7 sollten weniger als zwei G sein 4) In Posotion +5 und +10 muß A oder T sein.
Dabei wird das A im Startcodon als +1 und die Base davor als -1 definiert. Für das genannte offene Leseraster sind Regel 2 bis 4 erfüllt. Der Abstand zwischen der Shine-Dalgarno-Sequenz und ATG beträgt jedoch 12 Nukleotide.
Zur Identifizierung der "-10" und "-35" Regionen wurden die Konsensussequenzen von Rosenberg und Court (72) verwendet. Vor der "-35" Region findet sich wie gefordert eine AT-reiche Region (Abb. 15). Neben dem ersten Startcodon in Position 247, gerechnet von der PstI-Schnittstelle aus, wurden 6 weitere ATG-Tripletts im Leseraster in den Positionen 292, 319, 334, 469, 616 und 628 gefunden.

```
1                                                                  42
TGC AGA GCC TGA TGG GGC ATA AGT CCA TCA GCT CAA ACG AGG
          ———>                  <———

                                                                   84
TCT ACA CGA AGG TGT TTG CAC TGG ATG TGG CTG TAC GGC ACC

                                                                  126
GGG TGC AGT TTT CGA TGC CTG AGT CCG ATG CGG TCA CAA TGC

                                                                  168
TGA AAA ACA GAC ATG CAT AAT AAG TCA CAA TTA TGA ATT GTG

                                                                  210
ATT TCT TCT ATA AAA AAG AGA CCA CTG CAA TAT GTG ATC TCT

                                                                  252
TGT ATT ATT TCA TAA TTG TTA AAG CCA CTT CAC AGT ATG CTC
     ———>   <———                                      Met Leu

                                                                  294
ACA TTG TAC GGA TAT ATT CGT AAT GTT TTT TTA TAT CGA ATG
Thr Leu Tyr Gly Tyr Ile Arg Asn Val Phe Leu Tyr Arg Met

                                                                  336
AAC GAC AGA AGT TGT GGA GAT TTT ATG AAA GTA ATT AGC ATG
Asn Asp Arg Ser Cys Gly Asp Phe Met Lys Val Ile Ser Met

                                                                  378
AAA TTT ATT TTT ATT TTA ACG ATT ATT GCT CTT GCT GCT GTT
Lys Phe Ile Phe Ile Leu Thr Ile Ile Ala Leu Ala Ala Val

                                                                  420
TTT TTC TGG TCT GAA GAT AAA GGT CCG GCA TGC TAT CAG GTC
Phe Phe Trp Ser Glu Asp Lys Gly Pro Ala Cys Tyr Gln Val

                                                                  462
AGC GAT GAA CAG GCC AGA ACG TTT GTA AAA AAT GAT TAC CTG
Ser Asp Glu Gln Ala Arg Thr Phe Val Lys Asn Asp Tyr Leu
```

```
                                                                  504
CAA AGA ATG AAA CGC TGG GAC AAC GAT GTA CAA CTT CTT GGT
Gln Arg Met Lys Arg Trp Asp Asu Asp Val Gln Leu Leu Gly

                                                                  546
ACA GAA ATC CCG AAA ATT ACA TGG GAA AAG ATT GAG AGA AGT
Thr Glu Ile Pro Lys Ile Thr Trp Glu Lys Ile Glu Arg Ser

                                                                  588
TTA ACA GAT GTT GAA GAT GAA AAA ACA CTT CTT GTC CCA TTT
Leu Thr Asp Val Glu Asp Glu Lys Thr Leu Leu Val Pro Phe

                                                                  630
AAA GCT GAA GGC CCG GAG GGT AAG AGA ATG TAT TAT GGC ATG
Lys Ala Glu Gly Pro Glu Gly Lys Arg Met Tyr Tyr Gly Met

                                                                  672
TAC CAT TGT GAG GAG GGA TAT GTT GAA TAT GCG AAT GAC TAA
Tyr His Cys Glu Glu Gly Tyr Val Glu Tyr Ala Asn Asp

                                                                  714
TAC ACT GTT ATA AAG GCT GCA TAA AAA GCC GGA ACC CCG GCC
                                  ---->       <----

                                                                  756
CTT ATA TTA TCG CTT ACC ACT TTC TTT AAT GTG AAT TTC ACC
                                        ---->  <----

                                                                  798
AGG AAG CAG TAT CTG GTA CTC TTT ACC AGA AAA CAT CGC CCC
          ---------->       <----------

GAC GGA TCC
```

Abb. 15: Basensequenz des 0,8 kB großen HindIII/BamHI-Fragments aus pTO195. Darunter die Aminosäuresequenz für das offene Leseraster zwischen den Nukleotiden 246 und 670. Die Pfeile kennzeichnen Palindromsequenzen. Die erste Base dieser Sequenz entspricht der zweiten der Restriktionsstelle für PstI in pTO195.

Diesen Tripletts konnte auch jeweils eine Shine-Dalgarno-Sequenz zugeordnet werden. Allerdings sind nur für das dritte und vierte Triplett auch alle vier oben aufgeführten Regeln erfüllt. Der Abstand zwischen ATG und SD-Sequenz ist im zweiten und fünften Fall zu groß (14Bp bzw. 13Bp). Zudem wird Regel 3) im fünften Fall nicht erfüllt (Tabelle 3). Dem sechsten und siebten ATG-Triplett konnte keine RBS zugeordnet werden. Außer Ribosomenbindestellen vor fünf ATG-Tripletts konnten jeweils auch Promotorstrukturen vor diesen gefunden werden. Damit lassen sich diese Tripletts als Startcodons interpretieren. Der stärkste Promotor sollte nach diesen Daten jener vor dem dritten Startcodon sein, da dieser die größte Homologie zur Konsensussequenz aufweist (Tabelle 3). Initiationssequenzen innerhalb von offenen Leserastern wurden beispielsweise auch auf dem Col E1-Plasmid gefunden (13).

Nach dem ersten Stopcodon TAA (Position 670) folgt im Leseraster nach weiteren 21Bp ein zweites Stopcodon TAA. Dicht darauf folgt eine Sequenz, die intra Strang-Paarung ermöglicht (Palindrom) und die nur GC-Nukleotide enthält. Der dadurch mögliche Stiel würde 5Bp umfassen, die Schlaufe 4 Basen (Abb. 16). Darauf folgt eine AT-reiche Region (Abb. 15). Damit sind die Bedingungen für eine rho-unabhängige Termination der Transcription erfüllt. Eine rho-abhängige Termination erfordert die Sequenz CAATCAAAT, CAATCC AAAT oder CAATCAATT (72). Vier weitere Palindrome wurden gefunden, die in Abbildung 16 dargestellt sind. Das dem BamHI-Ende am nächsten gelegene Palindrom könnte das Terminationssignal für die Transcription von cma sein.

Ausreichende Homologien im Promotorbereich zu Konsenssussequenzen der Bindestellen des lexA-Proteins und des CRP-cAMP-Komplexes konnten nicht gefunden werden.

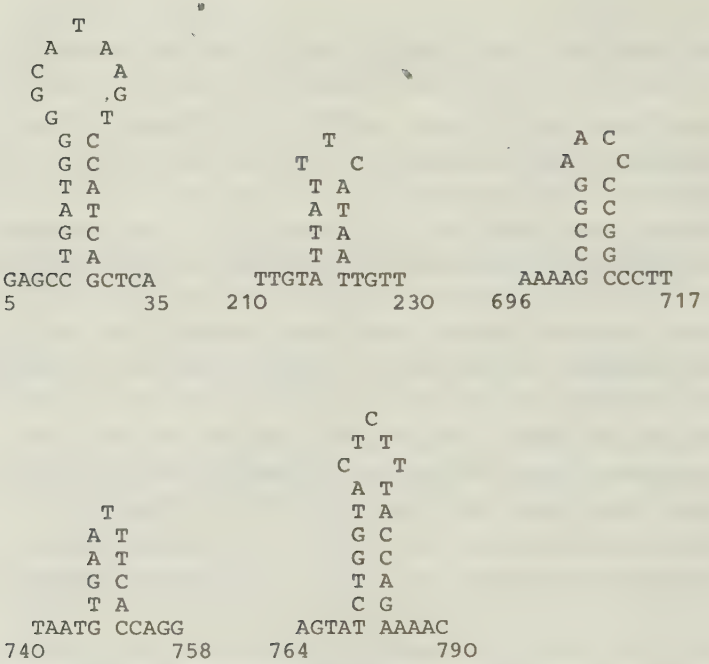

Abb. 16: Dargestellt sind die möglichen "Hair-Pin-Loop"-Stukturen enthaltenden Bereiche des 0,8kB großen sequenzierten PstI/BamHI-Fragments. Die Position der ersten und letzten Base dieser Bereiche ist jeweils angegeben, entsprechend der Lage in der Gesamtsequenz (Abb. 15).

Tabelle 3: Sequenzen der "-35"- und der "-10"-Region sowie der Shine-Dalgarno-"Box" der ersten 5 ATG-Tripletts im 423 Basen umfassenden offenen Leseraster. Die erste Zeile gibt die Konsenssussequenzen an (72/86).

	-35	-10	+1			
5'	tcTTGACat	TAtAaT	cat	TAAGGAGGT	ATG	3'
	-35	-10	+1			
	TTCATA	CAATAT	TGT	TAAAG	ATG	
	-42	-10	+1			
	TTGTATT	CACAGT	CAT	TAATG	ATG	
	-35	-10	+1			
	TTCACAG	TATATT	TGT	GGAG	ATG	
	-35	-10	+1			
	TTGTACG	TATATC	GAA	AAAG	ATG	
	-35	-10	+1			
	CTGAAGA	TATCAG	GAT	AATGA	ATG	

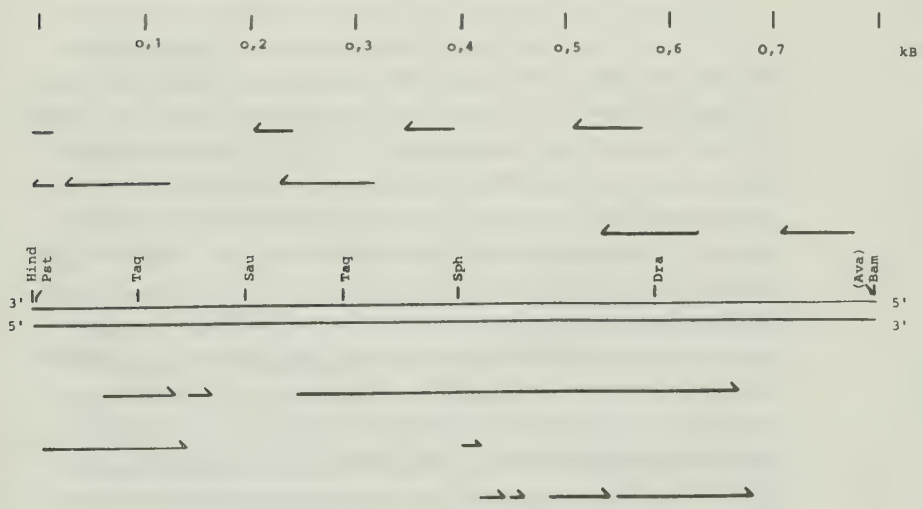

Abb. 17: Restriktionskarte des sequenzierten Bereichs. Eingezeichnet sind die Restriktionsstellen, die zu Subklonierungen benutzt wurden. Für beide DNS-Stränge sind die gefundenen offenen Leseraster in Leserichtung und Ausdehnung als Pfeile eingezeichnet. Jede Zeile mit Pfeilen entspricht einem der 6 möglichen Raster.

Die beiden nächst kleineren offenen Leseraster auf demselben Strang gelegen, sollen noch erwähnt werden (Abb. 17). Sie liegen in den verbliebenen beiden Leserastern. Das eine beginnt 12 Nukleotide vom PstI-Ende entfernt und ist 132Bp lang. Eine RBS konnte gefunden werden, die alle Regeln erfüllt. Promotorstrukturen können wegen der Randlage nicht vorhanden sein. Das andere beginnt 554 Nukleotide vom PstI-Ende entfernt und hat eine Kodierungslänge für 43 Aminosäuren. Neben einer RBS wurden auch Promotorstrukturen gefunden. Als Terminationssignal der Transcription könnte das Palindrom bei Position 696 (Abb. 16) genutzt werden. Weitere kleine Leseraster sind in Abbildung 17 eingezeichnet.

3.13. Untersuchungen zum Codongebrauch und GC-Gehalt

Die verwendeten Tripletts im größten offenen Leseraster wurden verglichen mit der Häufigkeit ihres Gebrauchs in Escherichia coli. 27% (=38 Tripletts) sind in E. coli selten verwendete Tripletts, 57% (=81 Tripletts) sind solche, die mit durchschnittlicher Häufigkeit verwendet werden und nur 16% (=22 Tripletts) sind häufig verwendete. Die Werte wurden erhoben nach den Angaben von Konigsberg und Godson (42).
In Escherichia coli werden bestimmte Tripletts bevorzugt in stark exprimierten Genen und andere in schwach exprimierten verwendet (71). Darauf wurde dasselbe Leseraster ebenfalls untersucht. 19% (=27 Tripletts) entsprechen Codons von stark exprimierten Genen, 42% (=59 Tripletts) solchen von schwach exprimierten und 9% (=13 Tripletts) solchen von durchschnittlich stark exprimierten Genen. Über den Rest von 30% (=42 Tripletts) läßt sich diesbezüglich keine Aussage machen, da es sich bei diesen um die einzige oder eine von zwei möglichen Codierungen für eine Aminosäure handelt.

Es konnte also festgestellt werden, daß mehr als ein Viertel selten verwendeten Codons und fast die Hälfte solchen aus schwach exprimierten Genen entsprach. Der GC-Gehalt liegt bei 40% für die gesamte sequenzierte Region und bei 36% für das 423Bp umfassende Leseraster. Der GC-Gehalt des Genoms von Escherichia coli beträgt zwischen 50% und 52% (25).

3.14. Die Aminosäuresequenz

Das größte offene Leseraster codiert für 141 Aminosäuren. Die Aminosäurezusammensetzung und die Aminosäuresequenz ist in Abbildung 15 und Tabelle 4 wiedergegeben. Ein Vergleich dieser Sequenz mit jener der Immunitätsproteine von Colicin A (47), Colicin E1 (68), Colicin E2 (46) und Colicin E3 (59) erbrachte keine Sequenzhomologien. Das Protein ist hydrophil (60% hydrophile Aminosäuren) und hat nur einen Bereich mit gehäuft auftretenden hydrophoben Aminosäuren. Dieser Bereich umfasst die Aminosäuren 32 bis 46. Zusammen mit dem davor liegenden Methionin und Lysin zeigt diese kurze Sequenz die Merkmale einer Signalsequenz: ...MKFIFILTIIALAA... (57). Das Protein trägt eine Nettoladung von 3 negativen Ladungen. Die Aminosäuresequenz wurde auch nach Chou und Fasman (15) analysiert, um Aussagen über die Sekundärstruktur machen zu können. Die Analyse ergab, daß die ersten 14 Aminosäuren wahrscheinlich in ß-Faltblattstruktur angeordnet sind, dann folgt ein "ß-turn". Im Bereich der Aminosäuren 24 bis 50 wechseln sich kurze Bereiche ab, die in α-Helix und dann wieder in ß-Faltblattstruktur vorliegen könnten. Der einzige weitere Bereich, der eine eindeutige Aussage zu Gunsten der ß-Faltblattstruktur zuläßt erstreckt sich von Aminosäure 32 bis 39. Die Aminosäuren 51 bis 89 bilden wohl keine definierte sekundäre Struktur aus.

Eine α-Helix erstreckt sich wahrscheinlich von Aminosäure 90 bis 108. Nur für den Bereich von Aminosäure 123 bis 131 ist noch mit einer definierten Sekundärstruktur, und zwar ß-Faltblatt, zu rechnen.
Das Protein enthält die Aminosäure Methionin siebenmal. Die ersten fünf Methionin-codierenden Tripletts könnten als Startcodons dienen. Die entsprechenden Proteine hätten folgende Molekulargewichte (in d): 19227 (141), 17184 (126), 15996 (117), 15348 (112) und 9281 (67). Die Zahlen in Klammern geben die Zahl der Aminosäuren pro Protein an. Würde wie oben diskutiert, die "Signalsequenz" nach dem vierten Methionin zwischen den beiden Alaninresten gespalten, bestünde das erhaltene Protein aus 99 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 13638 d. Die von pTO195 im in vitro-System exprimierten Proteine hatten die Molekulargewichte 19 k, 18 k, 14,5 k, 12,5 k, 9 k und 8 k (Tabelle 5).
Für ein zweites offenes Leseraster konnten Promotorstrukturen und eine RBS gefunden werden. Es codiert für 43 Aminosäuren. Dieses Protein hätte ein Molekulargewicht von 6349 d und eine Nettoladung von 11 positiven Ladungen.

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung des 19 k Proteins

Ala	7	Gly	8	Pro	4	Hydrophobe
Arg	8	His	1	Ser	5	Aminosäuren 57=40%
Asn	5	Ile	9	Thr	7	Hydrophile
Asp	10	Leu	11	Trp	3	Aminosäuren 84=60%
Cys	3	Lys	10	Tyr	10	Aminosäuren
Gln	4	Met	7	Val	9	insgesamt 141
Glu	12	Phe	8			Nettoladung 3-

Die hydrophoben Aminosäuren sind unterstrichen.

3.15. Klonierung von Teilbereichen des Immunitätsgens

Da die zusätzlichen auf der Sequenzierung von cmi beruhenden Daten auch keine eindeutige Aussage zuließen, welches der im in vitro-System gefundenen Proteine nun Immunität gegen Colicin M vermittelt, wurden Subklonierungen des cmi-Gens vorgenommen. Dazu wurden Restriktionsenzyme benutzt, deren Erkennungssequenzen innerhalb von cmi durch die Sequenzierung bekannt waren. Auch die nicht zur geplanten Klonierung geeigneten Enzyme wurden zur Restriktionskartierung eingesetzt, um so die Richtigkeit der ermittelten Sequenz zu stützen. Dies gelang in vollem Umfang.
Als Vektor diente für alle im folgenden aufgeführten Subklonierungen pUC19 (63). Der jeweils transformierte Stamm war JM101. Die linke Hälfte des cmi-Bereichs wurde mit HindIII/SphI kloniert (Abb. 18). Dieses Stück enthält die ersten vier möglichen Startcodons mit den kompletten Promotorstrukturen und Ribosomenbindestellen. Die Termination der Transcription als auch der Translation erfolgt erst im Vektor. Daneben wurde mit diesem Teilstück auch das 132Bp umfassende offene Leseraster, 12Bp vom PstI-Ende entfernt, kloniert. Das erhaltene Plasmid pTO198 verlieh keinerlei Immunität gegen Colicin M.
Die rechte Hälfte des cmi-Bereichs wurde mit SphI und BamHI kloniert (Abb. 18). Dieses Stück enthielt nur noch das vierte mögliche Startcodon mit der "-10" Sequenz und der RBS. Die "-35" Region fehlte. Das Plasmid pTO199 verlieh keine Immunität gegen Colicin M. Der in pTO199 klonierte DNS-Abschnitt enthielt zudem noch das offene Leseraster, das 554 Nukleotide vom PstI-Ende entfernt beginnt (Abb. 17 und Teil 3.12.). Mit HindIII/DraI wurden die ersten 600Bp kloniert (Abb. 18). Alle fünf möglichen Startcodons inklusive

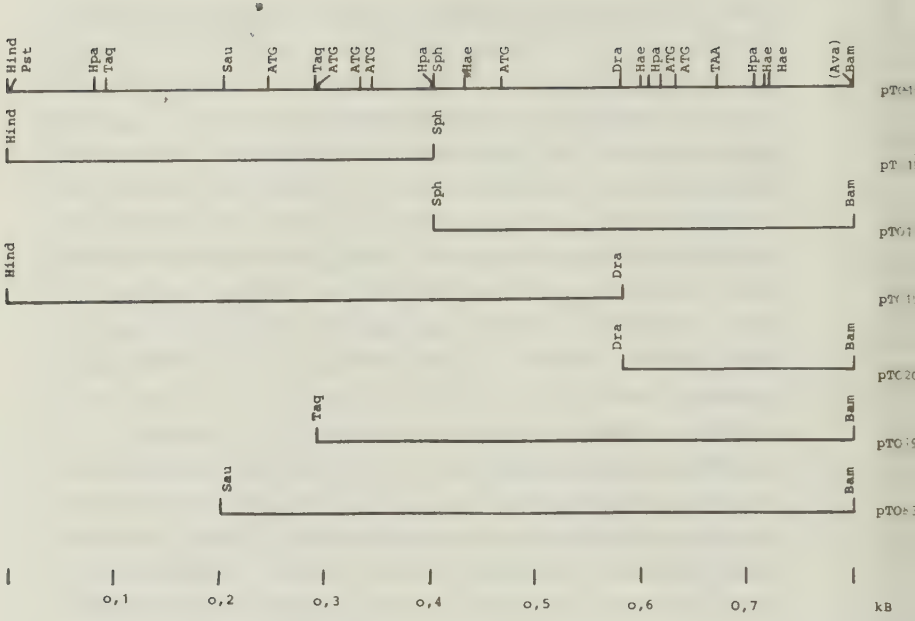

Abb. 18: Restriktionskarte der Insertion von pTO195. Angegeben ist die Position der Start- und Stopcodons des 423 Bp umfassenden offenen Leserasters. In den Zeilen darunter ist die Lage und Ausdehnung der subklonierten Bereiche wiedergegeben und die Enzyme, mit denen sie herausgeschnitten wurden. Der Vektor von pTO195 ist pCU8, von pTO196 bis pTO200 ist pUC19 und von pTO635 ist es pDS6. Die Bezeichnungen der Restriktionsenzyme sind unter 2.2.4. zu finden.

der RBS und Promotoren waren darauf vereinigt. Die Termination konnte erst im Vektor erfolgen für die Transcription wie auch die Translation. Auch pTO197 vermittelte keine Colicin M-Immunität.
Die letzten 200Bp wurden mit DraI und BamHI kloniert (Abb. 18). Dieser Bereich sollte keinerlei Startsignale für die Transcription tragen. JM101 mit pTO200 transformiert war voll Colicin M-sensitiv.
Durch die Klonierung des 500Bp umfassenden TaqI/BamHI-Bereichs wurde Plasmid pTO196 erhalten (Abb. 18). Bis auf das erste Starttriplett waren alle darauf vorhanden. Allerdings fehlte für das zweite ATG sowohl Promotor als auch die RBS. Für das dritte ATG war nur die RBS mitkloniert worden. Ein von diesem Startpunkt aus synthetisiertes Protein umfasste 117 Aminosäuren und damit 24 weniger wie das größtmögliche Protein. Für die restlichen zwei Starcodons waren alle Initiationssignale vorhanden. Die dazugehörenden Proteine wären um 29 bzw. 74 Aminosäuren verkürzt gegenüber dem vom ersten Startcodon aus synthetisierten Protein. pTO196 verlieh erst gegen eine 10^{-3}fache Verdünnung von Colicin M Immunität. Stämme mit diesem Plasmid sind aber damit noch um das 1000fache immuner im Vergleich zu vollsensitiven. Um eine Mutation auszuschliesen, die diese verringerte Immunität zur Folge hatte, wurde die Klonierung wiederholt mit demselben Ergebnis.
Um größere Mengen des Immunitätsproteins zu erhalten und um diese dann auch in vivo z.B. im Minizellsystem nachweisen zu können, wurde versucht, cmi in die Expressionsvektoren pDS5 und pDS6 (Abb. 5) (87) zu klonieren. Dazu wurde pTO195 mit Sau3A und pDS5 und 6 mit BamHI geschnitten, ligiert und H1605 damit transformiert. Durch Doppelspaltung mit BamHI und PstI sowie BamHI und EcoRI konnte die Orientierung der in-

serierten DNS ermittelt werden, da ein Ende dieser Insertion auch ein BamHI-Ende war. In allen Plasmiden, die aus 80 Transformanten isoliert wurden, war die Orientierung des klonierten Sau3A-Stücks so, daß cmi nicht vom P_{N25}x/o-Promotor des Vektors aus transcribiert wurde. Das mit pDS5 erhaltene Plasmid war pTO500. Es enthielt alle möglichen Startcodons. Nur für das erste fehlte der Promotor. Die RBS war vorhanden. pTO500 vermittelte volle Immunität gegen Colicin M. Ein zweiter Plasmidtyp wurde nach dieser Klonierung mit pDS5 als Vektor isoliert, der Immunität gegen Colicin M vermittelt. Plasmid pTO511 enthielt das Sau3A-Stück zweimal hintereinander. Auch mit pDS6 als Vektor wurden Colicin M-immune Klone erhalten, die das Sau3A-Stück einmal (pTO635) oder zweimal (pTO639) enthielten (Abb. 18).

Um die gewünschte Orientierung zu erzwingen, wurde pTO4 mit Sau3A und AvaI, pDS5 und pDS6 mit BamHI und SalI geschnitten. Das aus "niedrigschmelzender" Agarose isolierte 0,6kB große Fragment wurde mit den vorbereiteten Vektoren ligiert. Nach Transformation und Inkubation über Nacht wurden nur sehr kleine Transformanten erhalten. Ein Querstrichtest gegen Colicin M war nicht auswertbar, da nur am Startpunkt von jedem Ausstrich einige Kolonien wuchsen. Die Transformanten wurden nochmals über Nacht inkubiert und der Querstrichtest wiederholt. Die Kolonien der Transformanten wurden nicht größer und der Querstrichtest war wieder nicht auswertbar.

Die Ergebnisse der Klonierungsversuche mit den pDS-Vektoren wurden dahingehend interpretiert, daß die Zellen die starke Expression vom Promotor P_{N25}x/o aus nicht verkraften.

3.16. Versuche zum Nachweis der Proteine determiniert von Teilen des cmi-Bereichs

Im DNS-gesteuerten in vitro Translationssystem wurden sowohl die ganzen Plasmide als auch die klonierten DNS-Fragmente ohne Vektoranteile auf ihre Kodierungskapazität hin untersucht. Es wurde in allen Markierungsansätzen die gleiche DNS-Konzentration eingestellt. Bei den Ansätzen mit den aus Agarose reisolierten Restriktionsfragmenten konnte dies nicht immer gewährleistet werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf Polyacrylamidgelen, die Harnstoff enthielten (2.2.15.3.). Als Größenstandards wurden dieselben Proteine wie in 3.10. verwendet. Erwartet wurde, daß neben den Vektor-codierten Proteinen noch Proteine mit folgenden Molekulargewichten von pTO196 exprimiert würden: 16 k, 15 k und/oder 13,5 k, 9 k. Diese Werte gelten für die Proteine, die nach der Sequenzanalyse von dem klonierten TaqI/BamHI-Stück exprimiert werden könnten (3.14.), das 16 k-Protein allerdings nur vom Promotor des Vektors aus (3.15.). Die Werte für die im in vitro System markierten Proteine waren 14,5 k, 12,5 k, 9 k und 8 k (Abb. 19,o und Tabelle 5).
pTO511, pTO639 und pTO635 sollten für dieselben Proteine codieren wie pTO195, bis auf das größte vielleicht, da zwar die RBS nicht aber der Promotor dafür mitkloniert wurde. Gefunden wurde nur das Protein mit 14,5 k bei pTO511 und pTO639 (Abb. 19,h,f und Tabelle 5). Der Grund dafür ist wohl die schwache Markierung. pTO635 enthält das Sau3A-Stück nur einmal und dies hatte wohl eine noch schwächere Markierung zur Folge(Abb. 19,e und Tabelle 5).

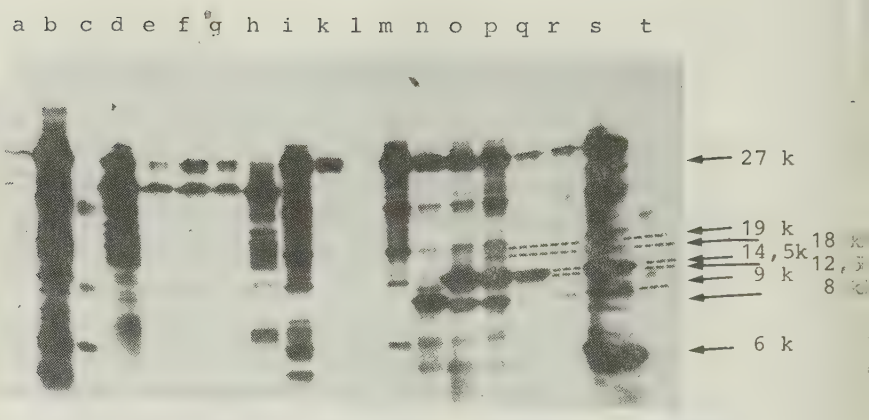

Abb. 19: Fluorographie eines Harnstoffgels mit ^{35}S-Methionin-markierten Proteinen. Exprimiert wurden die Gene von rekombinanten Plasmiden mit dem vollständigen sequenzierten HindIII/Bam HI-Fragment oder Teilen davon in pUC oder pDS-Vektoren: e, pTO635; f, pTO639; h, pTO511; k, pTO200; l, pTO198; m, pTO199; n, pTO197; o, pTO196; p, pTO195; q, pTO344; r, pTO345. Die von den Vektoren kodierten Proteine erscheinen in Spur d (pDS6), g (pDS5) und i (pUC8). pTO4 (Spur s) kodiert für cmi und cma. Einige Proteine wurden auch markiert, wenn keine DNS im in vitro-System eingesetzt wurde (Spur a). Spur b zeigt die vom Kontrollplasmid pAT153 exprimierten Proteine. Die radioaktiven Molekulargewicht-Standards (5,7 k, 6,5 k, 12,5 k 20 k, 29 k; siehe dazu 3.10.) sind in Spur c und t aufgetrennt worden.

Tabelle 5: Eigenschaften und exprimierte Proteine von Plasmid pTO195 und seinen verschiedenen Derivaten.

Plasmid	Vektor	cmi[a]	Proteine im *in vitro* System	Proteine nach Basen-Sequenz
pTO195	pUC8	+	19; 18; 14,5; 12,5; 9; 8	19; 17; 16; 15(13,5); 9
pTO196	pUC19	(+)	14,5; 12,5; 9; 8	16; 15(13,5) 9
pTO197	pUC19	-	15; 12,5; 10[b]	15,5; 13,5; 12; 11,5(10); 5,5
pTO198	pUC19	-	keine	7; 5; 4; 3
pTO199	pUC19	-	keine	9
pTO200	pUC19	-	keine	keine
pTO344	pUC8	+	19; 18; 14,5; 12,5; 9; 8	c
pTO345	pUC8	-	9; 8	c
pTO3412	pUC8	-	9; 8	c
pTO511	pDS5	+	14,5; 12,5 [d]	17; 16; 15(13,5) 9
pTO635	pDS6	+	keine[d]	17; 16; 15(13,5) 9
pTO639	pDS6	+	14,5; 12,5 [d]	17; 16; 15(13,5) 9

[a] Plasmid vermittelt Immunität gegen Colicin M: +,ja; -,nein (+), vermittelt reduzierte Immunität. [b] Doppelbande.
[c] Insertionsstelle von Tn1000 wurde nicht bestimmt.
[d] Schwache Markierung
Die Größe der Proteine ist in Kilodalton angegeben.

pTO197 mit dem vom 3'-Ende her verkürzten cmi sollte auch für verkürzte Proteine kodieren. Würde die Translation in den Vektor hinein nur für ein kurzes Stück fortgesetzt, so sollten die Proteine folgende Molekulargewichte haben: 15,5 k, 13,5 k, 12 k, 11,5k und 5 k. Die experimentell ermittelten Werte waren 15 k, 12,5 k und 10 k. Die 10 k-Bande war breit und ist wohl eine Doppelbande (Abb. 19,n und Tabelle 5).
Die Markierung der von pTO198 codierten Proteine übertraf die Hintergrund-Markierung nicht (Abb. 19,l). Erwartet wurde für den Fall, daß die Translation im klonierten Stück endet, stark verkürzte Proteine mit Größen von 7 k, 5 k, 4 k, 3 k. Auch bei optimaler Markierung wären diese Proteine wohl kaum zu identifizieren gewesen, da sie nur noch zwischen 57% und 14% Methionin im Vergleich zum 19 k-Protein haben. Auch die Stabilität der um 64% und um bis zu 84% verkürzten Proteine dürfte stark eingeschränkt sein.
pTO199 trägt zwar noch das fünfte Startcodon inclusive der dazugehörenden RBS, da aber der Promotor fehlt, sollte das Protein nur vom Promotor des Vektors aus exprimiert werden. Ein Protein, determiniert vom klonierten DNS-Stück, wurde nicht markiert (Abb. 19,m und Tabelle 5). Von dem auf diesem Restriktionsfragment ebenfalls lokalisierten und 129Bp umfassenden Leseraster (Abb. 17 und Kapitel 3.12.) wird demnach kein Protein exprimiert, obwohl die mögliche RBS und die Promotorsruktur mitkloniert wurden.
Für pTO200 gilt, daß nach der Sequenzanalyse von der klonierten DNS keine Proteine exprimiert werden. Tatsächlich wurden auch nur vom Vektor determinierte Proteine markiert (Abb. 19).
Von allen Subklonen des cmi-Bereichs wurden nicht nur die ganzen Plasmide, sondern auch die klonierten und reisolierten Fragmente im in vitro System untersucht,

Abb. 20: Fluorographie von ^{35}S-Methionin-markierten Proteinen, die auf einem Polyacrylamidgel mit 6M Harnstoff aufgetrennt wurden. Die Markierung erfolgte nach Zugabe der isolierten Insertionen aus den Plasmiden pTO195 (a), pTO196 (b), pTO197 (c), pTO198 (d), pTO199 (e), pTO511(f), pTO635 (g) und pTO639 (h) in ein DNS-gesteuertes in vitro System.In Spur i sieht man die Protein-Standards und in Spur k die vom Kontrollplasmid pAT153, welches im in vitro Transcriptions-Translations-"Kit" enthalten ist, exprimierten Proteine.

mit Ausnahme des in pTO200 klonierten Stücks. Es wurden dieselben Proteine markiert wie beim Einsatz der ganzen Plasmide, abgesehen von den Vektor-determinierten (Abb. 20). Dies gilt nicht für die in pTO197 inserierte DNS (vgl. Abb. 19,n mit Abb. 20,c). In diesem Fall erfolgte keine spezifische Markierung, wurde nicht das komplette Plasmid eingesetzt. Vermutlich ist das Fehlen der Terminationssignale auf dem klonierten Fragment der Grund dafür. Terminationssignale für Transcription und Translation liegen im Vektor. Auch die Ergebnisse der Expressionsversuche im in vitro System sprechen für die Richtigkeit der gefundenen Nukleotidsequenz. Daneben wurde eine weitere Einengung möglich bezüglich der Identifizierung von Cmi. Die kleineren Proteine mit 9 k und 8 k scheiden als Immunitätsproteine aus, da Colicin M-sensitive Tn1000-Insertionsmutanten diese exprimieren (Kapitel 3.10.) Die von pTO196 daneben noch codierten Proteine mit 14,5 k und 12,5 k verleihen den damit transformierten Stämmen nur eine stark reduzierte Immunität. Da nur uneingeschränkt immune Stämme ein Plasmid tragen, welches die Proteine mit 19 k und 18 k (pTO195) oder nur mit 18 k (pDS511, pDS635, pDS639) exprimieren können, kommen nur noch diese als Immunitätsprotein in Frage. Das in die pDS-Vektoren klonierte Sau3A-Fragment beinhaltet nur die RBS, nicht aber den Promotor für das 19 k-Protein. Entweder genügt die Expression des für das 18 k-Protein determinierenden Bereichs oder es wird ein Promotor des Vektors genutzt zur Transcription einer mRNS mit dem ersten ATG. In der Sequenz des Vektors konnte aber in der dafür notwendigen Region keine Promotorstruktur gefunden werden.

4. DISKUSSION

4.1. Klonierung von cmi, cma und cbi

Durch EcoRI-Spaltung von pColBM-Cl139 und pBR322 und anschließende Ligation wurde pTO163 erhalten. Damit transformierte Zellen waren immun gegen Colicin B und M und produzierten Colicin M. Durch Restriktionskartierung von pTO163 erhielt man eine physikalische Karte. Danach wurde versucht, dieselben Gene auf einem kleineren Fragment zuklonieren, indem man pTO163 Doppelspaltungen mit EcoRI/ClaI und PstI/EcoRI unterzog. Nach Ligation mit dem Vektor pBR322, der mit denselben Enzymen geschnitten worden war, erhielt man die Plasmide pCE2 und pPE6. Auch diese vermittelten Colicin M-Aktivität und Immunität gegen Colicin B und M. Die Insertion in pTO163 wurde durch Sau3A-Verdau und Ligation in die BamHI-Stelle von pBR322 auf 1,5 kB verkleinert. Das erhaltene Plasmid pTO4 verlieh Transformanten Immunität gegen Colicin M und die Fähigkeit zur Colicin M-Synthese. Durch Vergleich der Restriktionskarten dieser Plasmide wurde gezeigt, daß cbi rechts von cmi und cma liegt und daß alle drei Gene auf einem 2,1 kB großen PstI/ClaI-Stück liegen.
Durch die Klonierung von cmi, cma, cbi und zusätzlich cba in die BamHI-Stelle von pACYC184 erhielt Schramm (66) pES2. Die Insertion in pES2 stammte aus pF166. Der Vergleich zwischen pTO163 und pES2 ergab, daß cba rechts von cbi liegt. Außerdem zeigte er, daß trotz ansonsten verschiedener Ausgangsplasmide die Colicin-Regionen identisch sind.

4.2. Tn5-Insertionsmutanten von pTO163 und pES2

Tn5-Insertionen in cma der Plasmide pTO163 und pES2, ihre Kartierung und die Identifizierung verschiedener vekürzter Colicin M-Proteine durch Immunpräzipitation ermöglichte es, die Transcriptionsrichtung von cma festzustellen. Sie verläuft von rechts nach links, d.h. auf cmi zu.
Auf dieselbe Weise konnte gezeigt werden, daß die Transcriptionsrichtung für cba ebenfalls von rechts nach links und auf cbi zu verläuft. Insertionen in eines der Immunitätsgene auf pES2, die den völligen Ausfall der entsprechenden Immunität zur Folge gehabt hätte, wurden nicht gefunden. Eine verringerte Immunität nach Tn5-Mutagenese wurde jedoch einige Male festgestellt. Eine Insertion (225) hatte eine verringerte Immunität gegen Colicin M zur Folge. Durch Kartierung dieser Insertion war die Reihenfolge aller vier Colicin-Gene aufgeklärt worden:

cmi cma cbi cba

Keine Tn5-Mutante wurde gefunden, die keines der beiden Colicine mehr produzierte. Da aber Tn5-Insertionen in cba stets die Expression von Colicin M beeinträchtigten, der umgekehrt Fall aber nie beobachtet wurde, scheint die Transcription bevorzugt mit cba zu beginnen.
Hinweise auf eine Proform von Colicin M konnten nicht gefunden werden.

4.3. Versuche zur Subklonierung von cma und cmi

Nach Isolierung des in pTO163 inserierten EcoRI-Stücks, Spaltung dessen durch AvaI und PstI und Ligation in den mit SalI und PstI geschnittenen pUC8-Vektor wurde pTO195 erhalten. Dieses Plasmid vermittelte dem damit transformierten Stamm Immunität gegen Colicin M. Von

pTO195 wurden Tn1000-Mutanten hergestellt, die zum Teil nicht mehr für Colicin M-Immunität determinierten (pTO345 und pTO3412).
Die Klonierung von cma wurde in einem fhuA- und einem tonB-Stamm versucht. FhuA und TonB sind essentiell für die Anlagerung an und den Transport in die Zelle von Colicin M. Durch Klonierung von cma in fhuA- und tonB-Mutanten sollte die Hypothese geprüft werden, nach der Colicin M erst nach seiner Ausschleusung aus der Produzentenzelle und seinen Wiedereintritt in diese die Zelle abtöten kann. Auch in einen Stamm, der pTO195 trug und damit Colicin M-immun war, wurde versucht cma zu klonieren. Dazu wurde das cma tragende HindIII/AvaI-Stück aus pTO4 in den mit HindIII und SalI geschnittenen Vektor pACYC184 ligiert. Unter einigen hundert Transformanten wurde keine gefunden, die Colicin M produzierte und das erwartete Plasmid trug. Umso erstaunlicher ist dies, da die Klonierung der Aktivitätsgene alleine für Colicin E2 (38) und E3 (60) gelungen ist. Entweder wurden noch zu wenige Klone (ca. 600 Transformanten) untersucht oder der noch unverstandene Mechanismus der Colicin M-Immunität verhinderte solch eine Subklonierung.
Weder der Kulturüberstand noch die nach dem Zellaufschluß und Ultrazentrifugation erhaltenen Fraktionen aus cmi$^+$ Zellen, schützten sensitive Zellen vor Colicin M. Colicin M selbst konnte dagegen sowohl im Kulturüberstand als auch in den Zellaufschluß-Fraktionen der untersuchten Colicin M-Produzenten durch einfache Auftropftests gefunden werden.

4.4. Nachweis des Immunitätsproteins

Um cmi in beiden Orientierungen vorliegen zu haben, wurde es mittels HindIII und BamHI in pUC9 umkloniert.

Mit dem erhaltenen Plasmid pTO591, mit pTO195, pTO4, pTO163, pTO166 und Tn1000-Insertionsmutanten von pTO195 wurde erfolglos versucht, im Mini- und Maxizellsystem das Immunitätsprotein von Colicin M nachzuweisen. Doch trotz Verwendung verschiedener Gelsysteme, trotz Mitomycin C-Induktion und Zusatz von Colicin M oder fehlender Aminosäuren zu den Markierungsansätzen konnte das Immunitätsprotein nicht gefunden werden. Auch das Auftragen von ungekochten Proben auf die Gele brachte keinen Erfolg. Erst im DNS-gesteuerten *in vitro* Translationssystem konnten Proteine, determiniert von der Insertion in pTO195, nachgewiesen werden. Zwei Proteine mit den Molekulargewichten 14,5 k und 12,5 k wurden sehr stark markiert. Vier weitere Proteine wurden schwach markiert: 19 k, 18 k, 9 k und 8 k. Da die Colicin M-sensitiven Tn1000-Mutanten pTO345 und pTO3412 die beiden 9 k und 8 k großen Proteine ebenfalls exprimierten, kamen diese als Immunität-vermittelnde Proteine nicht in Betracht. pTO163 und pTO4 exprimierten dieselben von der jeweiligen Insertion kodierten Proteine wie pTO195. pTO4 exprimierte zudem noch ein 6 k Protein, das sehr stark markiert wurde. Vielleicht handelt es sich dabei um ein aminoterminal verküztes Cbi, da von pTO163 zwar *cbi* nicht aber dieses Protein exprimiert wird. Dieses würde dann vom tet^r-Promotor aus transcribiert.

4.5. Sequenzierung des *cmi*-Bereichs

Die Sequenzierung wurde notwendig, da noch vier Proteine als Colicin M-Immunitätsprotein in Frage kamen. Die Nukleotidsequenz ermöglichte die Lokalisierung zuvor unbekannter Restriktionsstellen. Diese wurden dann benutzt zur gezielten Klonierung kürzerer Stücke aus dem *cmi*-Bereich. Damit sollte eine Eingrenzung

des Immunitätsproteins möglich sein. Die Analyse der Sequenz ergab zunächst ein 423 Basen umfassendes offenes Leseraster. Initiations- und Terminationssignale dazu wurden identifiziert. Die Transcriptionsrichtung dieses als cmi interpretierten Gens verläuft entgegengesetzt zur Transcriptionsrichtung von cma. Diese Anordnung der Colicin M-Gene entspricht jener bei den Poren -bildenden Colicinen (13/47). Außerdem konnten vier weitere Initiationsstellen für die Transcription und Translation postuliert werden, da den vier weiteren ATG-Tripletts im großen Leseraster Promotorstrukturen und Ribosomenbindestellen zugeordnet werden konnten. Die damit möglichen 5 Proteine sollten folgende Molekulargewichte haben: 19 k, 17 k, 16 k, 15 k und 9 k. Die Aminosäuresequenz nach dem vierten Methionin mit 14 hydrophoben von 16 Aminosäuren enthält eine 12 Aminosäuren lange Sequenz, die alle Merkmale einer Signalsequenz aufweist. Würde dieses Protein exprimiert und prozessiert, so hätte die reife Form ein Molekulargewicht von 13,5 k. Vergleicht man die Größen der Proteine, abgeleitet aus der Sequenz mit jenen, die experimentell ermittelt wurden, so ergibt sich eine ganz gute Übereinstimmung: 19 k(19 k), 18 k(17 k), 14,5 k(16 k), 12,5 k(15 k oder 13,5 k), 9 k(9 k) und 8 k. Die Werte in Klammern sind die aus der Sequenz abgeleiteten. Daß eine Prozessierung im verwendeten in vitro System stattfindet, zeigte das Auftreten auch der reifen Form der ß-Lactamase. Nur das im in vitro System schwach markierte 8 k Protein kann aus der Sequenz nicht abgeleitet werden.

4.6. Subklonierung von Teilen des cmi-Bereichs

Neben der weiteren Eingrenzung des Immunitätsproteins sollte die gezielte Klonierung von Teilen des cmi-Bereichs auch zusätzlich ein Beleg für die Richtigkeit der Nukleotidsequenz sein.

Dies deshalb, da anhand der Sequenz die Größe von Restriktionsfragmenten vorhergesagt werden konnte und durch Restriktionskartierung und Klonierung nachgewiesen wurde. Kloniert wurde jeweils in pUC19 und zwar mit HindIII/SphI (0,4 kB), mit SphI/BamHI (0,4 kB), mit HindIII/DraI (0,6 kB) und mit DraI/BamHI (0,2 kB). Alle damit erhaltenen Plasmide enthielten Fragmente der vorausgesagten Größe und sie vermittelten keine Immunität gegen Colicin M. Auch das Klonnierte TaqI/BamHI-Stück hatte die erwartete Größe von 0,5 kB. Das rekombinante Plasmid pTO196 verlieh jedoch den damit transformierten Zellen eine um das 1000fache verringerte Immunität verglichen mit pTO195. Das wie erwartet 0,6 kB große Sau3A-Fragment wurde sowohl in den Expressionsvektor pDS5 als auch pDS6 inseriert. Es vermittelte völlige Colicin M-Immunität.

Im in vitro System wurden die Plasmide dieser Subklone und die inserierten Fragmente alleine auf von diesen kodierte Proteine untersucht. Nur das HindIII/DraI-, das TaqI/BamHI- und das Sau3A/BamHI-Fragment sollten nachweisbare Proteine exprimieren, wenn die gefundene Sequenz richtig ist. Die übrigen Fragmente oder Plasmide sollten für keine, wie das DraI/BamHI-Stück, oder kleine und wahrscheilich schwach markierte Proteine kodieren. Für das SphI/BamHI-Stück konnte keine Voraussage gemacht werden, da dem darauf befindlichen Promotor zur Expression ein Teil ("-35" Region) fehlte. Tatsächlich wurden Proteine von den in pUC19 klonierten Fragmenten nur exprimiert, wenn es sich dabei um das HindIII/DraI-, das TaqI/BamHI-, oder das Sau3A/BamHI-Fragment handelte. Damit war auch diese Voraussage bestätigt worden.

Für die Ergebnisse mit den isolierten Fragmenten ohne Vektor-DNS gilt dies ebenso, mit Ausnahme von Fragment

HindIII/DraI. Wurde dieses Fragment im in vitro System eingesetzt, so erfolgte keine spezifische Markierung. Vermutlich deshalb, weil diesem Stück die Terminationssignale für Translation und Transcription fehlen. Diese Signale sind jedoch in pUC19 auf der richtigen Seite und nahe bei der Insertionsstelle vorhanden.
Auch die Größe der Proteine entsprach jenen, die aus der Sequenz errechnet wurden. Dies traf sowohl für aminoterminal wie auch für carboxyterminal (HindIII/DraI) verkürzte Proteine zu.
Das TaqI/BamHI-Fragment exprimiert Proteine mit den Molekulargewichten 14,5 k, 12,5 k, 9 k und 8 k, das Sau3A/BamHI-Fragment sollte Proteine mit 18 k, 14,5 k, 12,5 k, 9 k exprimieren. Als eine schwache Bande konnten nur die sonst am stärksten markierten Proteine mit 14,5 k und 12,5 k nachgewiesen werden. Da das 18 k Protein immer recht schwach markiert wurde konnte nicht erwartet werden es in einem solchen Fall zu finden.
Zwei weitere offene Leseraster sind nach den vorliegenden Daten ohne Bedeutung, da Subklone mit diesen keine Immunität zeigten und kein Protein mit der entsprechenden Größe von 6 k exprimierten.
Das Immunitätsprotein hat also eine Größe von 19 k. Wird es vom aminoterminalen Ende her durch den Start der Translation erst vom zweiten ATG aus um 2 k (=15 Aminosäuren) verkürzt, so vermittelt es immer noch volle Immunität. Erst durch eine Verkürzung um 3 k (=24 Aminosäuren) verliert es weitgehend diese Eigenschaft. Noch weiter verkürzte Proteine oder ein um 27 Aminosäuren vom Carboxyterminus her verkürztes Protein sind völlig funktionsunfähig.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von Plasmid pColBM-C1139 wurden die Gene cmi, cma und cbi auf einem EcoRI-Stück in pBR322 kloniert. Das erhaltene Plasmid war pTO163. Durch Subklonierungen und Restriktionskartierung wurde gezeigt, daß diese Gene auf einem 2,1 kB großen PstI/ClaI-Fragment , in der Reihenfolge cmi cma cbi, liegen. Durch partiellen Sau3A-Verdau von pF166 wurde cmi,cma,cbi und cba in pACYC184 kloniert. Durch die Konstruktion von pES2 konnte die völlige Identität auf Restriktionsebene der Colicin BM-Region aus verschiedenen Plasmiden gezeigt und die Reihenfolge aller vier Gene festgelegt werden: cmi cma cbi cba.
Die Analyse der Tn5-Mutanten von pTO163 und pES2 führte zur Aufklärung der Transcriptionsrichtung von cma und cba. Sie ist für beide Gene gleich und verläuft auf das jeweilige Immunitätsgen zu.
Auch nach Induktion mit Mitomycin C lysierten die Colicin M und/oder B produzierenden Stämme nicht, sie wurden nicht einmal in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Dies zusammen mit der Beobachtung, daß Stämme mit einer nur 1,5 kB großen, cmi cma-tragenden Insertion in pBR322 (=pTO4) viel Colicin M produzieren und ins Medium ausschleusen, zeigte, daß kein Lysegen zur Ausscheidung von Colicin M notwendig ist.
Die Subklonierung von cma gelang nicht, obwohl sie in Colicin M-immunen, fhuA und tonB Stämmen versucht wurde.
pTO195 wurde erhalten durch Klonierung von cmi auf einem 0,8 kB großen PstI/AvaI-Fragment aus pTO163 in pUC8. Von diesem Fragment kodierte Proteine waren nur im DNS-gesteuerten in vitro System nachzuweisen. Die 19 k, 18 k, 14,5 k und 12,5 k großen Proteine, die als Immunitätsprotein in Frage kamen wurden auch von pTO163 und pTO4 exprimiert.

Die Sequenzierung von cmi ergab ein 423 Bp umfassendes offenes Leseraster in dem vier weitere ATG-Tripletts als Startcodons genutzt werden könnten. Die so erhaltenen Proteine hätten Molekulargewichte von 19 k, 17 k, 16 k, 15 k (13,5 k) und 9 k.
Die Subklonierung und Restriktionskartierung von Teilbereichen des cmi-Gens stützten die gefundene Sequenz. Das TaqI/BamHI-Restriktionsfragment aus der Insertion von pTO195 wurde in pUC19 kloniert. Dieses Plasmid, pTO196, vermittelt partielle Immunität gegen Colicin M. Stämme mit pTO196 sind 1ooofach sensitiver als immune, aber auch 1000mal immuner als sensitive Stämme. Dieses Fragment exprimiert im in vitro System bis auf die 19 k und 18 k Proteine dieselben wie pTO195. Das Sau3A/BamHI-Fragment aus der Insertion von pTO195 vermittelt dagegen volle Immunität gegen Colicin M. Demnach ist das Immunitätsprotein 19 k groß, kann aber um 2 k verkürzt noch volle Immunität bewirken, während eine Verkürzung um 3 k die Zellen nur noch partiell immun macht.

7. LITERATUR

1 Ansorge, W., Barker, R.(1984)
System for DNA sequenzing with resolution up to 600 base pairs.
J. Biochem. Biophys. Methods 9,33-47

2 Birnboim, H.C.(1983)
A rapid alkaline extraction methode for the isolation of plasmid DNA, in: Methods in enzymologie, Volume 100 (Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., eds.) Academic press, New York, pp.95-163

3 Bolivar, F.(1978)
Derivatives of plasmid pBR322 in genetic engineering, in: Molecular cloning vectors (Boyer, H.W., Nicosia, S., eds.) Elsevier/North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, pp.59-63

4 Bowmann, C.M., Sidikaro, J., Nomura, M.(1971)
Specific inactivation of ribosomes by Colicin E3 in vitro and mechanism of immunity in colicinogenic cells.
Natur New Biol.234,133-137

5 Braun, V.(1984)
Colicin M- Ein ungewöhnliches Bakteriocin, das die Mureinbiosynthese hemmt.
Forum Mikrobiol.7,20-23

6 Braun, V., Frenz, S., Hantke, K., Schaller, K.(1980)
Penetration of colicin M into cells of Escherichia coli.
J. Bacteriol.142,162-168

7 Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A.(1976)
Functional organisation of the outer membran of Escherichia coli: Phage and colicin rezeptors as components of iron uptake systems.
J. Supramol. Struct.5,37-58

8 Braun, V., Maas, E.(1984)
Colicin B consists of a single polypeptide chain.
FEMS Microbiol. Lett.21,93-97

9 Braun, V., Schaller, K., Wabl, M.R.(1974)
Isolation, characterization and action of colicin M.

10 Braun,V., Schaller, K., Wolff, H.(1973)
A common rezeptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 328,78-97

11 Braun, V., Wolff, H.(1973)
Characterization of the rezeptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of Escherichia coli B.
FEBS Lett.34,77-80

12 Bullock, J.O., Cohen, S.F., Dankert, J.R., Cramer, W.A.(1983)
Comparison of the macroscopic and single channel conductance properties of colicin E1 and its COOH-terminal peptide.
J. Biol. Chem.258,9908-9912

13 Chan, P.T., Ohmori, H., Tomizawa, J., Lebowitz, J.(1985)
Nucleotide sequenze and gene organisation of Col E1 DNA.
J. Biol. Chem.260,8925-8935

14 Chang, A.C.Y., Cohen, S.N.(1978)
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA clonig vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.
J. Bacteriol.138,1141-1156

15 Chou, A., Fasman, B.(1978)
Prediction of protein conformation.
Advanced Enzymologie 47,

16 Cole, S.T., Saint-Joans, B., Pugsley, A.P.(1985)
Molecular characterization of the colicin E2 operon and identification of its products.
Mol. Gen. Genet.198,465-472

17 Collins, J.(1979)
Cell-free synthesis of proteins coding for mobilisation functions of Col E1 and transposition functions of Tn3.
Gene 6,29-42

18 Cramer, W., Dankert, I.R., Uratani, Y.(1983)
The membrane channel forming bacteriocidal protein, Colicin E1.
Biochim. Biophys. Acta 737,173-193

19 Crozel, V., Lazdunski, C., Lloubes, R., Cavard, D.(1984)
A colicin A fragment containing the rezeptor binding domain can be directed to the periplasmic space in E. coli through gene fusion.
FEBS Lett.173,183-188

20 Dagert, M., Ehrlich, S.D.(1979)
Prolongend incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.
Gene 6,23-28

21 Davies, J.K., Reeves, P.(1975)
Genetics of resistance to colicins in E. coli K-12: Cross-resistance among colicins of group B.
J. Bacteriol.123,96-101

22 DeVries, J.K., Zubay, G.(1967)
DNA-directed peptide synthesis,II.-The sysnthesis of the αfragment of the enzyme ß-galactosidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57,1010-1012

23 Dougan, G, Saul, M., Twigg, A., Gill, R., Sherratt, D.(1979)
Polypeptides expressed in Escherichia coli K-12 minicells by transposition elements Tn1 and Tn3.
J. Bacteriol.138, 48-54

24 Dreher, R., Braun, V., Wittmann-Liebold,B.(1985)
Functional domains of colicin M.
Arch. Microbiol.140, 343-346

25 Felmlee, T., Pellets, S., Welch, R.A.(1985)
Nucleotide sequenze of an Escherichia coli
chromosomal hemolysin.
J.Bacteriol.163,94-105

26 Fredericq, P.(1951)
Recherche sur l'origine des mutants de Escherichia
coli V produisant la colicine M.
C.R. Soc. Biol.145,930-933

27 Fredericq, P., Smarda, P.(1970)
Complexité du facteur colicinogene B.
Ann. Inst. Pasteur 118,767-774

28 Frick. K.K., Quakenbush, R.L., Konisky, J.(1981)
Cloning of immunity and structural genes for
colicin V.
J. Bacteriol.148,498-507

29 Gaastra, W., Oudega, B., de Graaf, F.(1978)
The use of mutants in the study of structure-
function relationships in cloacin DF13.
Biochim. Biophys. Acta 540,301-312

30 Goldman, K., Suit, J.L., Kayalar, C.(1985)
Identification of the plasmid-encoded immunity
protein for colicin E1 in the inner membrane of
Escherichia coli.
FEBS Lett.190,319-323

31 Gottlieb, J.H., Duckworth, D.H.(1983)
Location of the abi, col and imm genes on pHUO11,
a colicin Ib plasmid derivative.
Gene 26,301-302

32 Gronenborn, B., Messing, J.(1978)
Methylation of single-stranded DNA *in vitro* induces new restriction endonuclease cleavage sites.
Natur 272,375-377

33 Guyer, M.S.(1978)
The ris sequenze of F is an insertion sequenze.
J. Mol. Biol.126,347-365

34 Guyer, M.S.(1983)
Uses of transposon rδ in the analysis of cloned genes, in: Methods in enzymologie, Volume 101 (Wu, R., Grossman, L., Moldave,L., eds.) Academic Press, New York, pp.362-369

36 Hardy, K.G.(1975)
Colicinogeny and related phenomena.
Bacterial. Rev.39,464-515

35 Hantke, K., Braun, B.(1976)
A function common to iron-enterochelin transport and action of colicins B,V,I in *Escherichia coli*.
FEBS Lett.59,277-281

37 Hashimoto, F., Horigome, T., Kanabayashi, M., Yoshida, K., Sugano, H.(1983)
An improved method for separation of low-molecular weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel.
Anal. Biochem.129,192-199

38 Inselburg, J.(1979)
Studies of colicin induction with an *imm*$^-$ *col*$^+$ mutant of the plasmid colicin E1.
Mol. Gen. Genet.173,333-338

39 Ito, K., Date, T., Wickner, W.(1980)
Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane, and proteolytic processing of the precursor of coliphage M13 coat protein.
J. Biol. Chem.255,2123-2130

40 Jakes, K., Zindler, N.D., Boon, T.(1974)
Purification and properties of colicin E3 immunity protein.
J. Biol. Chem.249,438-444

41 Jakes, K.,Zindler, N.D.(1984)
Plasmid colicin E3 specifies a lysis protein.
J. Bacteriol.157,582-590

42 Konigsberg, W., Godson, G.N.(1983)
Evidence for use of rare codons in the dnaG gene and other regulatory genes of Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 687-691

43 Konisky, J.(1978)
The bacteriocins, in: The bacteria, Volume 6: Bacterial diversity (Omoston, L.N., Sokatch, J.R., eds.) Academic Press, New York, pp72-136

44 Konisky, J., Tokuda, H.(1979)
Mode of action of colicin Ia, E1 and K.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A 244,105-120

45 Konisky, J.(1982)
Colicins and other bacteriocins with established modes of action.
Ann. Rev. Microbiol.36,125-144

46 Lau, P.C.K., Rowsome, R.W., Zucker, M., Visentin, L.P.(1984)
Comparative nucleotide sequences encoding the immunity proteins and the carboxyterminal peptides of colicins E2* and E3*.
Nucl. Acid. Res.12,8733-8745

47 Lloubes.R.P., Chartier, M.J., Journett, A.M., Varenne, S.G., Lazdunski, C.J.(1984)
Nucleotide sequence of the gene for the immunity protein to colicin A.
Eur. J. Biochem.144,73-78

48 Lugtenberg, B., Neijers, J., Peters, R., van der Hock, P., van Alphen, L.(1975)
Electrophoretic resolution of the major outer membrane proteins of Escherichia coli K-12 into four bands.
FEBS Lett.58,254-258

49 Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.(1982)
Molecular cloning.
Cold Spring Harbor Laboratory

50 Martinez, M.C., Lazdunski, C.,Pattus, T.(1983)
Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A.
EMBO J.2, 1501-1507

51 Masaki, H., Ohta, T.(1985)
Colicin E3 and its immunity genes.
J. Mol. Biol.182,217-227

52 Masaki, H., Toba, M., Ohta, T.(1985)
Structur and expression of the col E2-P9 immunity gene.
Nucl. Acid. Res.13,1623-1635

53 Matzuzawa, H., Ushiyama, S., Koyama, Y., Ohta, T. (1984)
Escherichia coli K-12 tolZ mutants tolerant to colicins E2, E3, D, Ia and Ib: defect in generation of the electrochemical proton gradient.
J. Bacteriol.160, 733-739

54 Meagher, R. B., Tait, R.C., Bettlach, M., Boyer, H.W.(1977)
Protein expression in Escherichia coli minicells by recombinant plasmids.
Cell 10, 521-536

55 Messing, J., Crea, R., Seeburg, P.H.(1981)
A system for shotgun DNA sequenzing.
Nucl. Acid. Res.9,309-321

56 Messing, J., Vieira, J.(1982)
A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments.
Gene 19,269-276

57 Michaelis, S., Beckwith, J.(1982)
Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in Escherichia coli.
Ann. Review. Microbiol.36,435-465

58 Mock. M., Pugsley, A.P.(1982)
The btuB group Col plasmids and homologie between the colicins they encode.
J. Bacteriol.150,1069-1076

59 Mock, M., Miyada, C.G., Gunsalus, R.P.(1983)
Nucleotide sequence for the catalytic domain of colicin E3 and its immunity protein. Evidence for a third gene overlapping colicin.
Nucl. Acid. Res.11,3547-3561

60 Mock, M., Miyada, C.G., Collier, R.J.(1984)
Genetik analysis of the functional relationship between colicin E3 and its immunity protein.
J. Bacteriol.159,658-662

61 Nagel,de Zwaig, R., Luria, S.E.(1967)
Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of Escherichia coli.
J. Bacteriol.94,1112-1123

62 Nomura, M., Witten, C.(1967)
Interaction of colicins with bacterial cells,III. Colicin-tolerant mutants in Escherichia coli.
J. Bacteriol.94,1023-1111

63 Norrander, J., Kempe, T., Messing, J.(1983)
Construction of improved M13 vectors using oligo-deoxy nucleotide-directed mutagenesis.
Gene 26,101-106

64 Ohno-Iwashita, Y., Imahori, K.(1980)
Assignement of the functional loci of colicin E2 and colicin E3 by the characterization of proteolytic fragments.
J. Biol. Chem.257,6446-6451

65 Ohno-Iwashita, Y., Imahori, K.(1982)
Assignement of the functional loci in the colicin E1 molecule by characterization of its proteolytic fragments.
Biochem.19,652-659

66 Ölschläger, T., Schramm, E., Braun, V.(1984)
Cloning and expression of the activity and immunity genes of colicins B and M on Col BM plasmids.
Mol. Gen. Genet.196,482-487

67 Oudega, B., Klausen-Boor, P., de Graaf, F.K.(1975)
Mode of action of the cloacin DG13 immunity protein.
Biochim. Biophys. Acta 392,184-195

68 Oka, A., Nomura, N., Morita, M., Sugisaki, H., Sugimoto. K.(1979)
Nucleotide sequence of small Col E1 derivatives: Structure of the regions essential for autonomous replication and colicin E1 immunity.
Mol. Gen. Genet.172,151-159

69 Pesti, L., Lucacs, K.(1981)
Staining technique for peptides of Escherichia coli heatstable enterotoxin.
Infect. Immun.33,944-947

70 Reeves, P.(1972)
The bacteriocins
Springer Verlag, Berlin

71 Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S. Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A. Eaton, M., Humphreys, G.(1984)
Codon usage can effect efficiency of translation of genes in Escherichia coli.
Nucl. Acid. Res.12,6663-6671

72 Rosenberg, M., Court, D.(1979)
Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription.
Ann. Rev. Genet.13,319-353

73 Rothstein, S.J., Jorgensen, R.A., Postle, K., Reznikoff, W.S.(1980)
The inverted repeats of Tn5 are functionally different.
Cell 19,795-805

74 Sancar, A., Hack, A.M., Rupp, W.D.(1979)
Simple methode for identification of plasmid-coded proteins.
J. Bacteriol.137,692-693

75 Sancar, A., Wharton, R.P., Selzer, S., Kacinsky, B.M., Clark, N.P., Rupp , W.D.(1981)
Identification of the uvrA gene product.
J.Mol. Biol.148,45-62

76 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.(1977)
DNA sequenzing with chain terminating inhibitors.
Proc, Natl. Acad. Sci. USA 74,5463-5467

77 Sanger, F., Coulson, A.R.(1978)
The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing.
FEBS Lett.87,107-110

78 Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F.,Hill, D.F., Peterson, G.B.(1982)
Nucleotide sequence of bacteriophage λDNA.
J. Mol. Biol.162,729-773

79 Sasarman, A., Massie, B., Zallinger, M., Gagne-Tellier, H., Shark, F., Garzon, S., Morrisset, R. (1980)
Naturally occuring Col BM plasmids belonging to the IncFIII incompatibility group.
J. Gen. Microbiol.119,475-483

80 Schaller, K., Nomura, M.(1976)
Colicin E2 is a DNA endonuclease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73,3989-3996

81 Schaller, K., Dreher, R., Braun, V.(1981)
Structural and functional properties of colicin M.
J. Bacteriol.146,54-63

82 Schaller, K., Krauel, A., Braun, V.(1981)
Temperatur-sensitive, colicin M-tolerant mutant of Escherichia coli.
J. Bacteriol.147,135-139

83 Schaller, K., Höltje, J.V., Braun, V.(1982)
Colicin M is an inhibitor of murein biosynthesis.
J. Bacteriol.152,994-1000

84 Schein, S., Kagan, B.L., Finkelstein, A.(1978)
Colicin K acts by forming voltage dependent channals in phospholipid bilayer membranes.
Nature 276,159-163

85 Schreier, P.H., Cortese, R.(1979)
A fast and simple methode for sequencing DNA cloned in the single stranded bacteriophage M13.
J. Mol. Biol.129, 169-172

86 Shine, J., Dalgarno, L.(1974)
The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense tripletts and ribosome binding site.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71,1342-1346

87 Stueber, D., Ibrahimi, J., Cuttler, D., Dobberstein, B., Bujard, H.(1984)
A novel in vitro transcription-translation system: accurate and efficient sysnthesis of single proteins from cloned DNA sequences.
EMBO J.3,3143-3148

88 Suttcliff, J.G.(1978)
Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.43,77-90

89 Tagg, J.R., Dajan, A.S., Wannamaker, L.W.(1976)
Bacteriocins of gram-positiv bacteria.
Bacteriol. Rev.40,722-756

90 Timmis, K.(1972)
Purification and characterization of Colicin D.
J. Bacteriol.109,12-20

91 Timmis, K., Cabello, F., Cohen, S.N.(1978)
Cloning and characterizetion of EcoRI and HindIII restriction endonuclease-generated fragments of antibiotic resistance plasmids R6-5 and R6.
Mol. Gen. Genet.162,121-137

92 Tokuda, H., Konisky, J.(1978)
Mode of action of colicin Ia: Effect of colicin on the Escherichia coli proton electrochemical gradient.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,2579-2583

93 Vieira, J., Messing, J.(1982)
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and squencing with synthetic universal primers.
Gene,19,259-268

94 Weaver, C.A., Pedborg, A.H., Konisky, J.(1981)
Plasmid-determined immunity of Escherichia coli K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein.
J. Bacteriol.148,817-828

95 Winnacker, E.L.(1984)
Ribosomale Bindungsstellen, in: Gene und Klone
Verlag Chemie, Basel, pp.217-224

96 Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J.(1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33,103-119

97 Yamamoto, H., Nishida, K., Beppu, T., Arima, K. (1978)
Tryptic digestion of colicin E2 and its active fragment.
J. Biochem.83,827-834

98 Zhang, S., Faro, A., Zubay, G.(1985)
Mitomycin induced lethality of Escherichia coli cells containing the Col E1 plasmid: involvement of the kil gene.
J. Bacteriol.163,174-179

99 Zimmermann, R., Henning, B., Neupert, W.(1981)
Different transport pathways of individual precursor proteins in mitochondria.
Eur. J. Biochem.116, 455-460

100 Zubay, G.(1973)
In vitro sysnthesis of protein in microbial systems.
Ann. Rev. Genet.7,267-287

LEBENSLAUF

Tobias Ölschläger

geboren am 21.03.1952 in Langenau/Ulm

1959 - 1964 Besuch der Volksschule in Endingen

1964 - 1973 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Balingen und Vaihingen

20.06.1973 Abitur

1973 - 1974 Zivildienst am Kreiskrankenhaus Reutlingen

1974 - 1975 Beschäftigt als Sektionsgehilfe am KKR

1975 - 1978 Studium der Biologie an der Albert Ludwigs Universität in Freiburg i. Br.

22.05.1978 Diplom-Vorprüfung an der Albert Ludwigs Universität in Freiburg i. Br.

1978 - 1980 Studium der Biologie an der Eberhard Karls Universität in Tübingen

1980 - 1981 Diplomarbeit am Lehrstuhl Mikrobiologie II bei Prof. V. Braun, Tübingen

21.09.1981 Diplom im Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Genetik, Pharmakologie und organische Chemie

1981 - 1985 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:
K. Apel, E. Bayer, R. Bergfeld, W. Bessler, V. Braun, H. Eggs, R. Dierstein, K. Hantke, R. Hausmann, G. Meyer, A. Müller, P. Overath, H. Prinzbach, A. Ritterbusch, J. Schröder, A. Schultz, W. Seyffert, H. Stegmann, M. Siess, F. Strohbusch, D. Vogellehner, G. Weitzel, O. Wilmanns, K. Wöhrmann, K.P. Zeller

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45